

TRAITÉ DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

en sa qualité d'office élu

| | |
|---|--|
| Date d'expédition 28 décembre 2000 (28.12.00) | |
| Demande internationale no: PCT/FR00/01723 | Référence du dossier du déposant ou du mandataire: CP/AC 59.782 |
| Date du dépôt international: 21 juin 2000 (21.06.00) | Date de priorité: 21 juin 1999 (21.06.99) |
| Déposant: BRUGIDOU, Christophe etc | |

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

☒ dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

01 août 2000 (01.08.00)

☐ dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:2. L'élection ☒ a été faite☐ n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur: (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé:

J. Zahra

no de téléphone: (41-22) 338.83.38

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

| | | |
|---|---|---|
| Référence du dossier du déposant ou du mandataire CP/AC 59.782 | POUR SUITE voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après A DONNER | |
| Demande internationale n° PCT/FR 00/ 01723 | Date du dépôt international (jour/mois/année) 21/06/2000 | (Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 21/06/1999 |

Déposant

INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DEVELOPPEMENT I.R.D.

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 3 feuilles.



Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Base du rapport

- a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.



la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.

- b. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :



contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.



déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.



remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.



remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.



La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.



La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2.



Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).

3.



Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le titre,



le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.



Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

5. En ce qui concerne l'abrégé,



le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant



le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure des dessins à publier avec l'abrégé est la Figure n°



suggérée par le déposant.



parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.



parce que cette figure caractérise mieux l'invention.



Aucune des figures n'est à publier.

Cadre III TEXTE DE L'ABREGE (suite du point 5 de la première feuille)

L'invention a pour but de fournir une méthode pour capturer les protéines cibles indispensables au cycle infectieux d'un virus pathogène, notamment du virus RYMV et de cloner les gènes impliqués dans ces processus. L'invention vise donc une méthode pour l'identification de marqueurs moléculaires de résistance au RYMV. La méthode implique l'isolation des complexes desdites protéines avec des particules virales.

On soumet les échantillons renfermant lesdits complexes à une électrophorèse et un Western Blot en utilisant un anticorps monoclonal anti-protéine de capsid, et on récupère les bandes non immunodétectées.

L'invention vise également un ADNc capable de s'hybrider avec un clone BAC (Bacterial Artificial Chromosome) criblé à partir d'une banque constituée de fragments d'ADN d'une variété de riz telle que IR64. Ce clone BAC renferme les séquences d'ADN des marqueurs identifiés à partir de riz grâce à un procédé comprenant la comparaison des profils AFLP (Amplified Length Polymorphism) des plantes de riz résistantes et sensibles.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 00/01723

| | | |
|--|---|--|
| A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 C12Q1/68 C07K14/415 | | |
| Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB | | |
| B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 C12Q C07K | | |
| Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche | | |
| Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS, CHEM ABS Data, STRAND, EMBL | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | |
| Catégorie ° | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
| A | BONNEAU CAROLINE ET AL: "Expression of the rice yellow mottle virus P1 protein in vitro and in vivo and its involvement in virus spread." VIROLOGY, vol. 244, no. 1, 25 avril 1998 (1998-04-25), pages 79-86, XP002149717 ISSN: 0042-6822 le document en entier | 1-14 |
| A | US 5 898 097 A (GAFNY RON ET AL) 27 avril 1999 (1999-04-27) le document en entier | 1-14 |
| -/-- | | |
| <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents </div> <div> <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </div> </div> | | |
| ° Catégories spéciales de documents cités: | | |
| <div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"&" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div> | | |
| Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée | | Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale |
| 16 octobre 2000 | | 30/10/2000 |
| Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale | | Fonctionnaire autorisé |
| Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 | | Reuter, U |

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|-----------|--|-------------------------------|
| A | <p>OPALKA NATACHA ET AL: "Movement of rice yellow mottle virus between xylem cells through pit membranes." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 95, no. 6, 17 mars 1998 (1998-03-17), pages 3323-3328, XP002149718 March 17, 1998 ISSN: 0027-8424 le document en entier</p> <p>---</p> | 1-14 |
| A | <p>ALBAR, L. (1) ET AL: "Genetic basis and mapping of the resistance to rice yellow mottle virus: I. QTLs identification and relationship between resistance and plant morphology." THEORETICAL AND APPLIED GENETICS, (NOV., 1998) VOL. 97, NO. 7, PP. 1145-1154., XP000892947 le document en entier</p> <p>---</p> | 1-14 |
| A | <p>PRESSOIR, G. ET AL: "Genetic basis and mapping of the resistance to rice yellow mottle virus: II. Evidence of a complementary epistasis between two QTLs." THEORETICAL AND APPLIED GENETICS, (NOV., 1998) VOL. 97, NO. 7, PP. 1155-1161., XP000892950 le document en entier</p> <p>---</p> | 1-14 |
| A | <p>WO 98 30721 A (PIONEER HI BRED INT ;BIRO RONALD L (US); FEAZEL RHONDA (US); HELEN) 16 juillet 1998 (1998-07-16) le document en entier</p> <p>---</p> | 1-14 |
| P,X | <p>DATABASE EMBL 'en ligne! embl; Database entry/Accession number AZ132900, 10 juin 2000 (2000-06-10) WING ET AL : "A BAC sequencing framework to sequence the rice genome" XP002149653 97,5 % identity to Seq.ID.no. 9 in a 121 nt overlap abrégé</p> <p>-----</p> | 8-14 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/01723

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| US 5898097 A | 27-04-1999 | NONE | |
| WO 9830721 A | 16-07-1998 | AU 6024598 A | 03-08-1998 |

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

REC'D 21 SEP 2001

WIP PCT

| | | |
|--|--|--|
| Référence du dossier du déposant ou du mandataire CP/AC 59.782 | POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416) | |
| Demande internationale n° PCT/FR00/01723 | Date du dépôt international (jour/mois/année) 21/06/2000 | Date de priorité (jour/mois/année) 21/06/1999 |
| Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12Q1/68 | | |
| Déposant INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DEVELOP. ... et al. | | |

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.


2. Ce RAPPORT comprend 7 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.

☐ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☒ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☐ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☒ Observations relatives à la demande internationale

| | |
|--|--|
| Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 01/08/2000 | Date d'achèvement du présent rapport 19.09.2001 |
| Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465 | Fonctionnaire autorisé Favre, N N° de téléphone +49 89 2399 7363 |



RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR00/01723

I. Base du rapport

1. En ce qui concerne les **éléments** de la demande internationale (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17)*):

Description, pages:

1-65 version initiale

Revendications, N°:

1-14 version initiale

Dessins, feuilles:

1/14-14/14 version initiale

Partie de la demande réservée au listage des séquences, pages:

1-4, telles que initialement déposées

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☒ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☒ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/01723

- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffre par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :
☐ des revendications, n°s :
☐ des dessins, feuilles :

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

III. Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle

1. La question de savoir si l'objet de l'invention revendiquée semble être nouveau, impliquer une activité inventive (ne pas être évident) ou être susceptible d'application industrielle n'a pas été examinée pour ce qui concerne :

- ☐ l'ensemble de la demande internationale.
☒ les revendications n°s 6 et 7.

parce que :

- ☐ la demande internationale, ou les revendications n°s en question, se rapportent à l'objet suivant, à l'égard duquel l'administration chargée de l'examen préliminaire international n'est pas tenue d'effectuer un examen préliminaire international (*préciser*) :
- ☒ la description, les revendications ou les dessins (*en indiquer les éléments ci-dessous*), ou les revendications n°s 6 et 7 en question ne sont pas claires, de sorte qu'il n'est pas possible de formuler une opinion valable (*préciser*) :
voir feuille séparée
- ☒ les revendications, ou les revendications n°s 6 et 7 en question, ne se fondent pas de façon adéquate sur la description, de sorte qu'il n'est pas possible de formuler une opinion valable.
- ☐ il n'a pas été établi de rapport de recherche internationale pour les revendications n°s en question.

2. Le listage des séquences de nucléotides ou d'acides aminés n'est pas conforme à la norme prévue dans l'annexe C des instructions administratives, de sorte qu'il n'est pas possible d'effectuer un examen préliminaire

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/01723

international significatif:

- ☐ le listage présenté par écrit n'a pas été fourni ou n'est pas conforme à la norme.
☐ le listage sous forme déchiffrable par ordinateur n'a pas été fourni ou n'est pas conforme à la norme.

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

| | |
|--|--|
| Nouveauté | Oui : Revendications 1-5 Non : Revendications 8-14 |
| Activité inventive | Oui : Revendications 1-5 Non : Revendications 8-14 |
| Possibilité d'application industrielle | Oui : Revendications 1-5 et 8-14 Non : Revendications |

**2. Citations et explications
voir feuille séparée**

VIII. Observations relatives à la demande internationale

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :
voir feuille séparée

Concernant le point III**Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle**

1. Les revendications de produit dans lesquelles les produits sont définis par leur procédé de fabrication ne sont acceptables que si les produits en tant que tels satisfont aux conditions de brevetabilité, à savoir entre autres, si ils sont **nouveaux** et si ils impliquent une activité inventive. Dans le cas des présentes revendications 6 et 7, il n'est cependant pas possible de déterminer si les protéines telles que définies satisfont à ces conditions de brevetabilité. Ceci est dû au fait que la seule caractéristique technique des dites protéines est le fait qu'elles forment un complexe avec un virus pathogène et qu'elles ne sont **pas** reconnues par un anticorps monoclonal anti-protéine de capsid du virus pathogène. Ces protéines ne sont cependant pas définies par une séquence d'acides aminés. De plus, ceci allant à l'encontre des arguments présentés par la demanderesse, les complexes formés de protéines virales et de protéines appartenant à la plante hôte varient d'un tissu à l'autre (page 2, ligne 6 à page 3, ligne 2). De ces faits, il n'est pas possible de différencier lesdites protéines par rapport à la plupart des protéines connues et inconnues, et il n'est pas possible de définir si les-dites protéines sont nouvelles.

Au vu des arguments ci-dessus, le manque de clarté (article 6 PCT) des revendications 6 et 7 est tel, qu'il n'est pas possible de formuler une opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle au sens des articles 33(2), 33(3) et 33(4) PCT (article 34(4) a) ii) PCT). De plus, la description ne supporte pas (article 6 PCT) la quantité non-définissable de protéines qui sont couvertes par la portée des dites revendications.

Concernant I point V

Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventiv et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. La date de priorité de la présente demande ayant été valablement revendiquée, le document "Database EMBL, 2000, Num. d'accès AZ132900" cité comme document "P" dans le rapport de recherche ne peut pas être considéré comme compris dans l'état de la technique au sens des articles 33(2) et 33(3) PCT.
2. Le document D1 (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 1998, 95:3323-3328) qui est considéré comme l'état de la technique le plus proche, décrit (cf. résumé, figure 1 et page 3323, colonne 2, ligne 37 - page 3324, colonne 1, ligne 2) une méthode d'isolement de protéines impliquées dans le transport d'un virus pathogène dont diffère la méthode qui fait l'objet de la revendication indépendante 1 en ce que ce sont les bandes non immunodétectées qui sont récupérées, et non pas les bandes détectées comme dans la méthode de D1. Cette différence permet la récupération de protéines appartenant à la plante hôte qui s'associent au virus pour former un complexe.
 - 2.1 Le problème que se propose de résoudre la présente revendication 1 peut donc être considéré comme étant de fournir une méthode de récupération de protéines appartenant à la plante hôte associées au virus sous forme de complexes.
 - 2.2 Aucun des documents de l'art antérieur présents ne divulgue ni ne suggère une de modifier la méthode de D1 pour arriver à un tel but.
La revendication indépendante 1 remplit donc les conditions requises par les articles 33(2) et 33(3) PCT.
 - 2.3 Les revendications dépendantes 2 à 5 définissent des variations de la méthode définie par la revendication 1 et sont donc aussi nouvelles et inventives au sens des articles 33(2) et 33(3) PCT.

3. Presque tout fragment d'ADN de trois ou quatre acides nucléiques remplit les conditions telles que définies par les revendications 8 à 14 (voir aussi les points III et VIII). De plus, certains des ADNc divulgués dans les documents D2 (Theor. Appl. Genet., 1998, 97:1145-1154; Fig. 2, chromosome 4) et D3 (Theor. Appl. Genet., 1998, 97:1155-1161; Fig. 1, chromosome 4) remplissent aussi lesdites conditions.

Les revendications 8 à 14 ne sont donc pas nouvelles au sens de l'article 33(2) PCT.

- 3.1 L'attention du demandeur est attirée sur le fait que l'isolation d'ADNc est triviale et que, par conséquent, un ADNc n'est considéré comme inventif au sens de l'article 33(3) PCT que si ledit ADNc est associé à une fonction particulière.

Concernant le point VIII

Observations relatives à la demande internationale

1. Les revendications 3 et 5 ne satisfont pas aux conditions requises à l'article 6 PCT, dans la mesure où l'objet pour lequel une protection est recherchée n'est pas clairement défini. Les revendications tentent de définir cet objet par le résultat à atteindre. De plus, un poids moléculaire est grandeur variable qui dépend des conditions d'électrophorèse, par exemple, ces conditions devraient donc aussi se trouver dans les revendications.
2. Les revendications 8 à 14 ne sont pas claires (article 6 PCT). Ces revendications tentent de définir un objet non-défini, i.e. un ADNc correspondant (cela signifie-t-il codant?) à une protéine non-définie (voir point III), où ledit ADNc est défini par un procédé utilisant une librairie indéfinie, i.e. un ensemble de clone BAC chevauchant une région entre 2 marqueurs microsatellites.

Translation

10/018433
PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

RECEIVED
APR 08 2002
TECH CENTER 160012900

| | | |
|---|---|---|
| Applicant's or agent's file reference CP/AC 59.782 | FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416) | |
| International application No. PCT/FR00/01723 | International filing date (day/month/year) 21 June 2000 (21.06.00) | Priority date (day/month/year) 21 June 1999 (21.06.99) |
| International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12Q 1/68 | | |
| Applicant INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DEVELOPPEMENT (I.R.D.) | | |

| | |
|---|--|
| <p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>7</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p> | |
| <p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p> | |

| | |
|---|---|
| Date of submission of the demand 01 August 2000 (01.08.00) | Date of completion of this report 19 September 2001 (19.09.2001) |
| Name and mailing address of the IPEA/EP | Authorized officer |
| Facsimile No. | Telephone No. |

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/01723

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-65, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages _____, filed with the letter of _____,
 pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. 1-14, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19.
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. _____, filed with the letter of _____,
 Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/14-14/14, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/01723

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application.

☒ claims Nos. 6, 7

because:

☐ the said international application, or the said claims Nos. _____
relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

☒ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. 6, 7
are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

See separate sheet

☒ the claims, or said claims Nos. 6, 7 are so inadequately supported
by the description that no meaningful opinion could be formed.

☐ no international search report has been established for said claims Nos. _____

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: BOX III

Product claims in which the products are defined in terms of their production method are only acceptable if the products *per se* fulfil the criteria of patentability, that is to say, *inter alia*, if they are **novel** and involve an inventive step. However, with regard to the present Claims 6 and 7, it is not possible to determine whether the proteins as defined fulfil those patentability criteria. This is due to the fact that the only technical feature of the said proteins is the fact that they form a complex with a pathogenic virus and that they are **not** recognised by a capsid anti-protein monoclonal antibody of the pathogenic virus. These proteins are not, however, defined by an amino acid sequence. Furthermore, and contrary to the arguments put forward by the applicant, the complexes formed by viral proteins with proteins of the host plant vary from one tissue to another (page 2, line 6, to page 3, line 2). For these reasons, it is not possible to differentiate the said proteins from the majority of known and unknown proteins, and neither is it possible to determine whether the said proteins are novel.

In view of the foregoing points, Claims 6 and 7 are so unclear (PCT Article 6) that no opinion can be formed as to novelty, inventive step or industrial applicability within the meaning of PCT Article 33(2), (3) and (4) (PCT Article 34(4)(a)(ii)). Furthermore, the description does not support (PCT Article 6) the undefinable number of proteins covered by the scope of these claims.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 00/01723

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

| | | | |
|-------------------------------|--------|--------------|-----|
| Novelty (N) | Claims | 1-5 | YES |
| | Claims | 8-14 | NO |
| Inventive step (IS) | Claims | 1-5 | YES |
| | Claims | 8-14 | NO |
| Industrial applicability (IA) | Claims | 1-5 and 8-14 | YES |
| | Claims | | NO |

2. Citations and explanations

1. Since the priority date claimed by the present application is validly claimed, the document "Database EMBL, 2000, Access N° AZ132900", which is cited in the search report as a P-category document, cannot be considered to represent prior art within the meaning of PCT Article 33(2) and (3).
2. D1 (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 1998, 95: 3323-3328), which is considered to represent the closest prior art, describes (see abstract; Figure 1; and page 3323, column 2, line 37, to page 3324, column 1, line 2) a method for isolating proteins involved in transporting a pathogenic virus, from which the method defined in independent Claim 1 differs in that the non-immunodetected bands are recovered, and not the detected bands as in the method of D1. This difference makes it possible to recover proteins belonging to the host plant which link with the virus to form a complex.
- 2.1 Thus, the problem addressed by the present Claim 1 can be considered to be that of providing a method for recovering proteins belonging to the host plant

and linked to the virus as complexes.

- 2.2 None of the available prior art documents either discloses or suggests modifying the method of D1 to achieve that aim.

Consequently, independent Claim 1 satisfies the requirements of PCT Article 33(2) and (3).

- 2.3 Dependent Claims 2-5 define variations of the method defined in Claim 1 and are therefore likewise novel and inventive within the meaning of PCT Article 33(2) and (3).

3. Almost any DNA fragment of three or four nucleic acids satisfies the criteria defined in Claims 8-14 (see also Boxes III and VIII). Moreover, some of the cDNAs disclosed in D2 (Theor. Appl. Genet., 1998, 97: 1145-1154; Figure 2, chromosome 4) and D3 (Theor. Appl. Genet., 1998, 97: 1155-1161; Figure 1, chromosome 4) also satisfy those criteria. Claims 8-14 are therefore not novel within the meaning of PCT Article 33(2).

- 3.1 The applicant should note that the isolation of cDNA is widely known and that a cDNA is therefore only considered to be inventive within the meaning of PCT Article 33(3) if the said cDNA is associated with a particular function.

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. Claims 3 and 5 do not meet the requirements of PCT Article 6 in so far as the subject matter for which protection is sought is not clearly defined. These claims attempt to define that subject matter in terms of the result to be attained. Furthermore, a molecular weight is a variable quantity which depends on the electrophoresis conditions, for example; these conditions should therefore also appear in the claims.
2. Claims 8-14 are unclear (PCT Article 6). These claims attempt to define non-defined subject matter, i.e. a cDNA corresponding to (does this mean coding for?) a non-defined protein (see Box III), where said cDNA is defined by reference to a method using a non-defined library, i.e. a BAC clone set spanning a region between 2 microsatellite labels.

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
28 décembre 2000 (28.12.2000)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 00/79001 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷: C12Q 1/68,
C07K 14/415

Londres (FR). GHESQUIERE, Alain [FR/FR]; 1275 Rue
de la Roqueturière, F-34000 Montpellier (FR).

(21) Numéro de la demande internationale:
PCT/FR00/01723

(74) Mandataires: PEAUCELLE, Chantal etc.; Cabinet Ar-
mengaud Aine, 3, Avenue Bugeaud, F-75116 Paris (FR).

(22) Date de dépôt international: 21 juin 2000 (21.06.2000)

(81) États désignés (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,
NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(30) Données relatives à la priorité:
99/07831 21 juin 1999 (21.06.1999) FR

(84) États désignés (*régional*): brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*):
INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DEVEL-
OPPEMENT (I.R.D.) [FR/FR]; 213 Rue La Fayette,
F-75480 Paris Cedex 10 (FR).

(72) Inventeurs; et

Publié:

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*): BRUGI-
DOU, Christophe [FR/FR]; 3 Avenue Sainte Cécile,
F-34570 Pignan (FR). BRIZARD, Jean-Paul [FR/FR];
Lotissement Le Mas Bouis, F-34380 Saint Martin de

— Avec rapport de recherche internationale.
— Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont
requies.

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: MEANS FOR IDENTIFYING A NOVEL CLASS OF GENES RESISTANT TO THE RICE YELLOW MOTTLE VIRUS
AND THE LOCUS OF A MAJOR GENE OF RESISTANCE TO THE VIRUS, AND THEIR APPLICATIONS

(54) Titre: MOYENS POUR L'IDENTIFICATION D'UNE NOUVELLE CLASSE DE GENES DE RESISTANCE AU VIRUS
DE LA PANACHURE JAUNE DU RIZ ET DU LOCUS D'UN GENE MAJEUR DE LA RESISTANCE AU VIRUS, ET LEURS
APPLICATIONS

(57) Abstract: The invention concerns a method for capturing the target proteins indispensable to the infectious cycles of a patho-
genic virus, in particular the rice yellow mottle virus (RYMV) and for cloning the genes involved in said processes. The invention
therefore concerns a method for identifying molecular markers of the resistance to RYMV. The method involves the isolation of said
protein complexes with viral particles. The method consists in subjecting the samples containing said complexes to electrophoresis
and Western Blot using a capsid anti-protein monoclonal antibody, and in recuperating the non-immunodetected bands. The invention
also concerns a cDNA capable of being hybridized with a BAC (Bacterial Artificial Chromosome) screened from a bank consisting
of DNA fragments of a variety of rice such as IR64. Said BAC clone contains DNA sequences of the markers identified from the
rice by means of a process which consists in comparing the AFLP (Amplified Length Polymorphism) of resistant and sensitive rice
plants.

WO 00/79001 A1

(57) Abrégé: L'invention a pour but de fournir une méthode pour capturer les protéines cibles indispensables au cycle infectieux d'un
virus pathogène, notamment du virus RYMV et de cloner les gènes impliqués dans ces processus. L'invention vise donc une méthode
pour l'identification de marqueurs moléculaires de résistance au RYMV. La méthode implique l'isolation des complexes desdites
protéines avec des particules virales. On soumet les échantillons renfermant lesdits complexes à une électrophorèse et un Western
Blot en utilisant un anticorps monoclonal anti-protéine de capside, et on récupère les bandes non immunodétectées. L'invention
vise également un ADNc capable de s'hybrider avec un clone BAC (Bacterial Artificial Chromosome) criblé à partir d'une banque
constituée de fragments d'ADN d'une variété de riz telle que IR64. Ce clone BAC renferme les séquences d'ADN des marqueurs
identifiés à partir de riz grâce à un procédé comprenant la comparaison des profils AFLP (Amplified Length Polymorphism) des
plantes de riz résistantes et sensibles.



En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

Moyens pour l'identification d'une nouvelle classe de gènes de résistance au virus de la panachure jaune du riz et du locus d'un gène majeur de la résistance au virus, et leurs applications.

L'invention a pour objet des moyens, outils et procédés, pour
5 l'identification d'une nouvelle classe de gènes de résistance au virus de la panachure jaune du riz (en abrégé RYMV pour Rice Yellow Mottle Virus) et du locus d'un gène majeur de la résistance au virus.

Elle vise plus spécialement, en tant qu'outils, des protéines essentielles pour le cycle infectieux ainsi que des marqueurs et des amorces PCR et leurs
10 applications à l'établissement de la cartographie physique de la résistance et au clonage du gène.

RYMV est un virus endémique en Afrique. Il présente des caractéristiques communes avec les autres sobémovirus ; à savoir un seul ARN simple brin de polarité positive non polyadénylé et de petite taille, et des particules
15 icosahédriques de symétrie T=3 produites en très grande quantité dans la plante. Les particules virales sont aussi très présentes dans les tissus vasculaires et principalement dans les vaisseaux. Chez quelques rares variétés de l'espèce africaine de riz cultivé *Oryza glaberrima*, une résistance très élevée au RYMV a été identifiée. Mais comme les hybrides interspécifiques entre les deux espèces
20 de riz cultivées sont extrêmement stériles, les recherches antérieures n'ont pas permis de décrire ni de bases génétiques, ni de mécanisme de cette résistance.

Les travaux des inventeurs dans ce domaine ont montré qu'une variété dénommée *Gigante*, originaire du Mozambique et identifiée par l'ADRAO, de l'espèce asiatique de riz cultivé *Oryza sativa*, manifestait les mêmes
25 caractéristiques que celles observées chez *O. glaberrima*. Les inventeurs ont

caractérisé la résistance à RYMV en mettant en évidence qu'elle est liée à un gène majeur de résistance récessif et identique chez les deux sources de résistance considérée (*O. Sativa* et *O. glaberrima*).

Cette résistance intervient au niveau du mouvement de cellule à cellule et se traduit par un blocage du virus au niveau des cellules infectées alors que la
5 réplication du virus est normale.

Les travaux des inventeurs sur le RYMV ont montré que ce virus bouge et se multiplie différemment au cours du cycle infectieux. Dans la feuille inoculée (I, figure 11), c'est sous forme d'un complexe ARN viral et protéines virales
10 (protéines de capsid, P1 et le cas échéant P3) qu'il se déplace localement en traversant les plasmodesmes des cellules épidermiques, des cellules du mésophylle, des cellules de la gaine périvasculaire (méstome et cellule de la gaine) pour atteindre les cellules vasculaires (parenchyme phloémien et xylémien). Il se multiplie plus particulièrement dans les cellules du parenchyme
15 xylémien (II, figure 11). Dans les cellules vasculaires, avant le mouvement dit de longue distance, il s'encapside et se stabilise sous forme d'une particule compacte dans la vacuole à un pH acide et grâce aux ions divalents Ca_2^+ (II, figure 11). L'infection systémique ne peut se faire que si un grand nombre de particules stables sont produites. Dans les feuilles systématiquement infectées, le
20 virus sort des tissus conducteurs pour se multiplier soit dans les jeunes tissus vasculaires, soit dans les cellules du mésophylle. A ce stade de l'infection le mouvement local se fait sous forme décapsidée (complexe viral RNA et protéines) ou encapsidée toujours à travers les plasmodesmes (III, figure 11).

Lors de ces différentes étapes du cycle infectieux, le complexe viral et /ou
25 le virion ont besoin d'être identifié et transporté par des protéines de la plante pour bouger, d'un compartiment cellulaire à un autre, d'une cellule à l'autre.

Par exemple, les protéines de plantes liées au transport du virus ou de son complexe apparaissent présenter une fonction similaire (transport), mais sont

spécifiques du tissu traversé (épiderme, mésophylle, mestome, gaine périvasculaire, phloème, xylème). Lorsque ces protéines sont traduites de l'allèle sauvage, ce sont des protéines de susceptibilité qui permettent au virus de se déplacer. Au contraire, l'allèle muté apparaît conduire soit à une protéine moins
5 fonctionnelle (résistance partielle), soit non fonctionnelle (résistance totale).

Il est donc considéré que ces protéines appartiennent à une famille de gènes dont la fonction cellulaire commune serait la reconnaissance du substrat et le transport à travers les plasmodesmes, mais sont différentes au niveau de la spécificité tissulaire (épiderme, mésophylle, mestome, gaine périvasculaire,
10 phloème, xylème).

La régulation du transport symplastique est très probablement la fonction essentielle de cette famille de gènes.

Le RYMV est aussi un virus très stable et il se présente dans la cellule sous plusieurs isoformes dont trois ont été déterminées : compacte, gonflée et
15 intermédiaire. Ainsi, suivant le pH cellulaire (cytoplasme 7-8, vacuoles, vésicules et vaisseaux 4,5-6,5) la conformation et la charge extérieure de la particule changent. Cette charge lui permet de s'accrocher aux membranes et d'entrer dans une cellule saine par un mécanisme d'endocytose. Enfin, au niveau cellulaire, les inventeurs ont montré que ce virus s'accumule principalement dans les vacuoles.
20 La présence *in planta* de trois isoformes, la compartimentation et l'accumulation virale dans les plantes partiellement résistantes ont ainsi permis de proposer un mécanisme original pour la tolérance au RYMV, distinct de la résistance.

La tolérance au RYMV apparaît en effet s'effectuer grâce à une accumulation dans les vacuoles. Le tonoplaste, en séparant physiquement les
25 particules virales du compartiment cellulaire, empêcherait toute interaction dommageable pour la machinerie cellulaire. Ainsi, le virus se multiplie, s'accumule sans tuer la cellule (donc pas de symptômes).

L'association entre la cellule hôte et le virus est tel que la plante se comporte alors comme une plante réservoir.

Dans ce modèle la co-évolution entre le virus et la plante hôte a conduit le virus à s'adapter pour finalement être reconnu par la plante comme une simple
5 protéine de réserve qui serait produite par la plante, transportée via le reticulum et l'appareil de Golgi vers la vacuole. Une invagination intense du tonoplaste (mécanisme d'autophagie) pourrait aussi permettre au virus produit dans le cytoplasme de s'accumuler dans la vacuole.

De même, ce mécanisme est également similaire à celui observé pour la
10 détoxification de la cellule pour les métaux lourds ou le sel par exemple.

Compte tenu de ces résultats, les inventeurs ont élaboré une méthode pour identifier des protéines impliquées dans la reconnaissance et le transport ciblé de virus pathogènes dans les plantes, et cloner les gènes impliqués dans ces processus.

15 L'invention a donc pour but de fournir une méthode pour capturer les protéines cibles indispensables au cycle infectieux d'un virus pathogène notamment du virus RYMV et vise les protéines ainsi isolées.

L'invention a également pour but de fournir un procédé pour l'identification de marqueurs moléculaires du locus de résistance au RYMV.

20 Elle vise également, en tant que tels, les fragments d'ADN tels que révélés par ce procédé, et utilisables en tant que marqueurs.

L'invention vise en outre les applications de tels marqueurs, notamment pour définir d'autres marqueurs de haute spécificité vis-à-vis du locus de résistance et pour prédire un phénotype résistant.

L'invention vise tout particulièrement l'application desdits marqueurs pour établir la cartographie physique de la résistance et pour le clonage du gène.

L'invention vise encore, en tant que nouveaux produits, les séquences des amorces utilisées dans les techniques PCR mises en oeuvre.

5 La méthode d'isolement de protéines impliquées dans la reconnaissance et le transport ciblé d'un virus pathogène circulant via les plasmodermes dans une plante est caractérisée en ce qu'on soumet des échantillons renfermant des complexes desdites protéines avec des particules virales à une électrophorèse et un Western Blot en utilisant un anticorps monoclonal anti-protéine de capsid, et
10 on récupère les bandes non immunodétectées.

Selon une variante, le complexe est obtenu à partir de virus extrait de plantes sensibles infectées.

Le virus est plus particulièrement le virus de RYMV et on récupère des protéines de 5, 24, 42, 49, 59, 66, 70, 77 et 210 kDa.

15 Selon une autre variante, le complexe est obtenu à partir de virus purifié et mis en contact avec les protéines d'une suspension cellulaire de plante sensible.

En particulier, le virus est le virus de RYMV et on récupère des protéines de 24, 45, 51, 57, 63, 85 et au-delà de 120 kDa.

20 Les protéines telles qu'obtenues par la méthode définie ci-dessus entrent également dans le cadre de l'invention en tant que produits nouveaux.

L'invention vise l'application de ces protéines en particulier pour le clonage des gènes de résistance à des virus pathogènes circulant via les plasmodermes dans une plante.

25 L'invention vise en outre l'identification de marqueurs du locus d'un gène majeur de résistance à RYMV, comprend l'utilisation de marqueurs AFLP (Amplified Fragments Length Polymorphism) et fait appel à la technique PCR.

Ce procédé d'identification est caractérisé en ce qu'il comprend

- l'amplification sélective de fragments d'ADN de riz d'une part d'individus résistants, d'autre part d'individus sensibles, descendant de variétés parentales, ces fragments ayant été préalablement soumis à une étape de digestion, puis de
5 ligation pour fixer des adaptateurs complémentaires d'amorces ayant, à leur extrémité, un ou plusieurs nucléotides spécifiques, l'une des amorces du couple étant marquée aux fins de révélation,

- la séparation des produits d'amplification, par électrophorèse sur gel dans des conditions dénaturantes, et

10 - la comparaison des profils d'électrophorèse obtenus avec des mélanges de fragments issus de descendants résistants et des mélanges issus de descendants sensibles, avec les fragments provenant des variétés parentales, aux fins d'identification de bandes dont le polymorphisme est génétiquement lié au locus de résistance, cette identification étant suivie le cas échéant, à titre de validation,
15 d'une vérification sur chacun des individus et du calcul du taux de recombinaison génétique entre le marqueur et le locus de résistance.

Dans un mode de réalisation de l'invention, les fragments d'ADN sont obtenus par digestion des ADN génomiques de plantes résistantes d'une part, et de plantes sensibles d'autre part, et de leurs parents, à l'aide d'enzymes de
20 restriction.

Des enzymes de restriction qui se sont révélées appropriées comprennent EcoRI et MseI.

De courtes séquences nucléotidiques sont fixées aux fragments de digestion (adaptateurs) pour générer des extrémités franches auxquelles sont
25 ensuite fixés des adaptateurs.

Les amorces utilisées dans l'étape d'amplification sont complémentaires de ces adaptateurs avec, à leur extrémité 3', de 1 à 3 nucléotides qui peuvent être variables.

5 L'étape d'amplification est conduite avantageusement selon la technique PCR.

Des profils d'amplification spécifiques sont obtenus avec des couples d'amorces possédant à leur extrémité, respectivement, des motifs AAC et CAG, ACC et CAG, ou encore AGC et CAG.

10 Les séquences correspondant aux adaptateurs EcoRI et MseI sont respectivement GAC TGC GTA CCA ATT C (SEQ ID N°1) et GAT GAG TCC TGA GTA A (SEQ ID N° 2).

15 Les couples d'amorces mis en oeuvre pour l'amplification sont alors avantageusement choisis parmi E-AAC/M-CAG ; E-ACC/M-CAG ; et E-AGC/M-CAG ; dans lesquels E et M correspondent respectivement à SEQ ID N° 1 et SEQ ID N°2. D'autres couples sont donnés dans le tableau 6 dans les exemples.

20 L'étude comparative des profils d'amplification obtenus permet de révéler des bandes polymorphes spécifiquement présentes chez les variétés sensibles et leurs descendants sensibles, comme exposé dans les exemples, et correspondant en conséquence à des marqueurs de résistance.

En particulier, la révélation sur gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes conduit à l'identification de 2 bandes marqueurs M1 et M2 respectivement de 510 pb et 140 pb.

Ces 2 bandes déterminent, d'après l'analyse des données de ségrégation, un segment chromosomique de 10 à 15 cM portant le locus de résistance et sont situées de part et d'autre de ce locus, à 5-10 cM.

5 Selon une disposition du procédé de l'invention, les bandes polymorphes identifiées en tant que marqueurs spécifiques du locus de la résistance au RYMV sont isolées à partir des gels. On opère avantageusement par excision des gels d'électrophorèse. Cette étape d'isolement est suivie d'une purification en procédant selon les techniques classiques. On dispose ainsi de fragments d'ADN.

10 Selon une autre disposition de l'invention, lesdits fragments purifiés sont clonés dans un vecteur approprié, tel qu'un plasmide, introduit dans des cellules hôtes, notamment des cellules bactériennes comme celles de *E. coli*.

Selon encore une autre disposition de l'invention, les fragments d'ADN purifiés et clonés sont séquencés.

15 Mettant à profit les séquences des inserts correspondant auxdits fragments d'ADN, l'invention fournit également un procédé d'obtention de marqueurs de grande spécificité vis-à-vis du locus d'un gène majeur de résistance au RYMV. Ce procédé est caractérisé en ce qu'on définit des couples d'amorces PCR complémentaires de fragments de la séquence d'un insert donné, on procède à une amplification spécifique de l'insert à l'aide de ces couples d'amorces, puis on
20 soumet les produits d'amplification à une migration sur gel d'électrophorèse.

Ces séquences d'ADN sont utilisables pour identifier un polymorphisme lié au locus de résistance dans une variété de riz à étudier suivant différents procédés, ainsi que décrit dans les exemples :

1) en identifiant directement un polymorphisme de taille de ces séquences d'ADN après amplification spécifique et séparation des fragments sur gel d'agarose,

2) en digérant les produits d'amplification par des enzymes de restriction
5 pour séparer les produits de digestion sur gel d'agarose,

3) en utilisant ces séquences comme des sondes pour hybrider l'ADN de variétés de riz préalablement digérées par une enzyme de restriction et déterminer un polymorphisme de restriction.

L'invention vise, en tant que nouveaux produits, les bandes AFLP
10 polymorphes telles qu'identifiées par le procédé défini ci-dessus, à partir d'ADN de plantes de riz, et le cas échéant isolées, purifiées et séquencées.

Ces bandes AFLP sont caractérisées en ce qu'elles sont spécifiquement mises en évidence dans une variété sensible au RYMV (IR64) et dans la fraction de plantes sensibles issues du croisement de cette variété avec la variété
15 résistance Gigante comme décrit dans les exemples.

L'invention vise tout spécialement les séquences d'ADN correspondant à ces bandes polymorphes, et qui permettent de définir un segment du chromosome 4 de 10-15 cM portant le locus de résistance au RYMV.

Compte tenu de leur procédé d'obtention, les bandes AFLP correspondent
20 à des fragments de restriction et en particulier, conformément à un mode de réalisation du procédé de l'invention, à des fragments EcoRI - MseI.

Des fragments de ce type sont appelés marqueurs M1 et M2 et sont caractérisés par une taille, respectivement, de 510 pb et de 140 pb en gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes.

Ces fragments sont caractérisés en ce qu'ils correspondent à des séquences
5 d'ADN flanquant le locus de résistance et situés de part et d'autre de ce dernier à 5-10 cM.

L'invention vise un ADNc tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce que lesdites séquences d'ADN correspondant auxdites bandes polymorphes, portent le locus de résistance à RYMV et définissent un segment inférieur à 10cM.

10 L'invention vise également des fragments clonés dans des vecteurs tels que plasmides, ces vecteurs de clonage en tant que tels, caractérisés par le fait qu'ils comportent de tels fragments, et les cellules hôtes transformées à l'aide de ces vecteurs, tels que des cellules bactériennes comme *E. coli*. L'invention vise notamment la séquence d'ADN correspondant au fragment identifié comme
15 marqueur M1 et répondant à la séquence SEQ ID N° 3 suivante :

CGTGCTTGCTTATAGCACTACAGGAGAAGGAAGGGGAACACAACAGC
CATGGCGAGCGAAGGTTCAACGTCGGAGAAACAGGCTGCGACGGGCA
GCAAGGTGCCGGCGGGCGGATCGGAGGAAGGAAAAGGAGGAAATCGA
20 AGTTATGCTGGAGGGGCTTGACCTAAGGGCAGATGAGGAGGAGGATG
TGGAATTGGAGGAAGATCTAGAGGAGCTTGAGGCAGATGCAAGATGG
CTAGCCCTAGCCACAGTTCATACGAAGCGATCGTTTAGTCAAGGGGCT
TTCTTTGGGAGTATGCGCTCAGCATGGAAGTGCAGGAAAGAGTAGAT
TTCAGAGCAATGAAAGACAATCTGTTCTCGATCCAATTCAATTGTTTG
25 GGGGATTGGGAACGAGTTATGAATGAAGGTCCATGGACCTTTCGAGG
ATGTTTCGGTGCTCCTCGCAGAAATATGATGGCTGGTCCAAGATTGAAT

La séquence d'ADN du marqueur M1 présente une taille de 471 pb.

L'invention vise encore, en tant que nouveaux produits, les séquences de
30 nucléotides utilisées comme amorces d'amplification en PCR.

De telles amorces comprennent les couples E-AAC/M-CAG ; E-ACC/M-CAG ; E-ACC/M-CAG ; dans lesquels E et M correspondent respectivement à SEQ ID N° 1 et SEQ ID N° 2.

D'autres amorces encore sont complémentaires de séquences identifiées dans la séquence du fragment désigné par marqueur M1. Il s'agit en particulier de séquences (5', 3') choisies parmi :

AGGAAGGGGAACACAACAGCC (21 pb) (SEQ ID N° 4)
TTATGCTGGAGGGGCTTGACC (21 pb) (SEQ ID N° 5)
GCAGTTCCATGCTGAGCGCAT (21 pb) (SEQ ID N° 6)
CCGAACATCCTCGAAAGGTCC (21 pb) (SEQ ID N° 7)
TCATATTCTGCGAGGAGCACC (21 pb) (SEQ ID N° 8)

L'invention vise également la séquence d'ADN correspondant au fragment identifié comme marqueur M2 et répondant à la séquence SEQ ID N°9

AATTCACCCC ATGCCCTAAG TTAGGACGTT CTCAGCTTAG TGGTGTGGTA
GCTTTTTTCTA TTTTCCTAAG CACCCATTGA AGTATTTTGC ATTGGAGGTG
GCCTTAGGTT TGCCTCTGTTA

La taille de M2 est de 120 pb.

Des amorces spécifiques complémentaires des séquences identifiées dans la séquence de M2 ont été définies. De telles séquences répondent aux enchaînements suivants (5', 3') :

SEQ ID N°10
AACCTAAGGCCACCTCCAAT
SEQ ID N°11
GCAAACCTAAGGCCACCTC

SEQ ID N°12

ATTACACCCCATGCCCTAAG

5 Selon encore un autre aspect, l'invention vise l'utilisation des séquences d'ADN obtenues avec les amorces ci-dessus pour définir des polymorphismes permettant l'identification de phénotypes résistants.

10 L'invention concerne également un procédé d'identification de la séquence d'ADN portant le gène majeur de la résistance au RYMV. Ce procédé est caractérisé par le criblage d'une banque constituée de fragments d'ADN de 100 à 150 kb de la variété IR64 ou autre, telle que la banque BAC (Bacterial Artificial Chromosomes), clonés dans des bactéries, pour sélectionner le ou les clones de la banque renfermant les marqueurs définis ci-dessus et le gène de résistance au RYMV.

Une telle banque BAC est disponible auprès de l'IRRI.

15 Pour identifier le gène du ou des clones sélectionnés, on procède à l'identification à partir du jus brut de protéines extraites de plantes, de la fraction, puis de proche en proche, de la protéine qui mise en présence de virus purifié permet le mouvement de cellule à cellule dans la variété résistante. La ou les protéines candidates sont alors séquencées partiellement soit à partir de l'extrémité N-terminale, soit à partir de fragments internes libérés par hydrolyse. 20 Des amorces peuvent être ainsi définies et sont utilisées pour amplifier des ADNc correspondants. Aux fins de validation, on vérifie que ces ADNc vont obligatoirement aller hybrider les clones BAC placés dans l'intervalle compris entre les marqueurs microsatellites.

25 En variante, on procède au sous-clonage du fragment BAC contenant le gène en éléments de plus petite taille sous forme de cosmides qui sont ensuite

réordonnés de manière à couvrir l'ensemble du clone BAC de départ. Ces cosmides sont utilisés en transformation génétique pour réaliser un test de complémentation fonctionnelle permettant de valider la séquence contenue dans le cosmide et correspondant à l'ADNc isolé par l'approche protéine. Il s'agit en l'occurrence de démontrer que la synthèse de la protéine responsable du mouvement du virus de cellule à cellule permet de rendre sensible la variété résistante.

L'invention vise ainsi un ADNc capable de s'hybrider avec un clone BAC criblé à partir d'une banque constituée comme indiqué ci-dessus de fragments d'ADN de 100 à 150 kb d'une variété de riz telle que IR64, par exemple de banque BAC (Bacterial Artificial Chromosomes), ce clone BAC appartenant à un contig (ou ensemble de clones BAC chevauchant) de clones BAC renfermant les séquences d'ADN des marqueurs identifiés à partir de riz grâce au procédé défini ci-dessus.

Conformément à l'invention, le gène de résistance peut être transféré à des variétés sensibles par voie conventionnelle grâce à l'utilisation de marqueurs génétiques spécifiques qui lui sont liés. Ainsi des variétés résistantes pourront être développées beaucoup plus facilement et beaucoup plus rapidement.

On notera de plus avec intérêt que la séquence de ce gène facilite l'accès à des gènes de résistance d'autres virus (Potyvirus par exemple) qui sont pathogènes d'autres plantes, mais caractérisés par le même mécanisme (mouvement de cellule à cellule). L'invention fournit ainsi des moyens de grand intérêt pour l'amélioration des plantes basés sur des résistances naturelles aux pathogènes des végétaux.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention seront donnés dans les exemples qui suivent, dans lesquels il est fait référence aux figures 1 à 15 qui représentent respectivement

- la figure 1 : le clonage du marqueur M1 dans le plasmide PGEMTeasy.
5 La digestion du plasmide montre un fragment d'ADN de 510 pb correspondant à la bande M1 ;

- la figure 2 : l'amplification du marqueur M1 dans les quatre variétés de riz (Azucena, Gigante, IR64 et Tog5681) en utilisant les couples d'amorces
2-4) : 291 pb ; (2-5) : 310 pb ; (1-3) : 288 pb ;
10 (1-4) : 406 pb ; (1-5) : 425 pb ; (2-3). Le fragment M1 est légèrement plus grand chez Tog5681 que chez les autres variétés ;

- la figure 3 : l'identification de sites de restriction sur la séquence du marqueur M1 chez les 4 variétés IR64, Azucena, Gigante et Tog5681 ;

- la figure 4 : la digestion du marqueur M1 avec l'enzyme HpaII après
15 amplification PCR en utilisant les couples d'amorces (1-3), (1-4) et (1-5) sur les quatre variétés (Azucena, Gigante IR64 et Tog5681). La présence d'un site de restriction HpaII dans les variétés IR64 et Tog5681 libère un fragment de 86 pb qui réduit d'autant la taille du fragment amplifié,

- la figure 5 : la caractérisation du marqueur M1 sur les plantes sensibles
20 et résistantes de la descendance F2 (IR64 x Gigante). Les plantes F2 résistantes ont le profil du parent résistant (IR64-absence du site HpaII), à l'exception d'un seul recombinant, les plantes résistantes ont le profil du parent sensible (IR64-présence du site HpaII) à l'exception de deux recombinants ;

- la figure 6 : la ségrégation du marqueur M1 dans la population HD (IR64 x Azucena) : IR64-Azucena-30 individus HD (IR64 x Azucena);

- la figure 7 : la carte de liaison génétique du chromosome 4 du riz avec le positionnement du marqueur M1 et l'identification de l'intervalle dans lequel se trouve le locus de résistance ;

- la figure 8 : l'hybridation du marqueur M1 utilisé comme sonde sur des membranes portant l'ADN des 4 variétés (IR64, Azucena, Gigante et Tog5681) digérées par 6 enzymes de restriction ApaI, KpnI, PstI, ScaI, HaeIII. La variété Tog5681 présente un profil de restriction différent des autres variétés pour l'enzyme ScaI qui peut être utilisée pour marquer le locus de résistance de cette variété ; et

- la figure 9 : l'hybridation du marqueur M1 utilisé comme sonde sur des membranes portant l'ADN d'individus issus de recroisement (IR64 x Tog5681) x Tog 5681 et digérés avec l'enzyme ScaI. Cette descendance est en ségrégation pour la résistance au RYMV. Les individus sensibles (5) montrent tous la bande d'IR64 associée à la bande de Tog5681 (individus hétérozygotes). Les individus résistants (9) ne montrent que la bande de Tog5681 à l'exception d'un individu recombinant,

- la figure 10 : la cartographie et l'ancrage du locus de résistance élevée au RYMV sur la carte IR64 x Azucena,

- la figure 11, le mouvement du virus de RYMV dans une plante, après inoculation dans une feuille,

- la figure 12, les chromatogrammes à partir de virus extraits de plantes sensibles infectées, et

- les figures 13 à 15, un chromatogramme après injection de virus, un gel SDS PAGE et un immunoblot avec un anticorps anti-protéine de capsid.

Exemple 1 : Identification des variétés sources de résistance

Les variétés utilisées dans l'étude de la résistance et en particulier les deux variétés résistantes Gigante et Tog5681 ont été caractérisées grâce à des marqueurs microsatellites sur un échantillonnage représentatif de loci.

5 Le polymorphisme se manifeste par le nombre de répétitions d'un court motif nucléotidique, le plus souvent binucléotidique qui est caractéristique d'une variété donnée.

Sur un ensemble de loci, les allèles répertoriés permettent de disposer des caractéristiques spécifiques de chaque variété.

10 La mise en évidence de ces marqueurs microsatellites s'effectue par l'amplification de l'ADN avec des amorces spécifiques déterminées par Chen et *al.*(1), suivie d'une migration sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes suivant le protocole décrit par les mêmes auteurs.

15 Le tableau 1 donne les résultats à partir d'un système de référence établi par Chen *et al.*, ci-dessus suivant lequel les allèles sont identifiés par le nombre de répétitions du motif comparativement à la variété IR36 qui sert de témoin. Les deux variétés Gigante et Tog5681 sont ainsi décrites spécifiquement sur 15 loci vis-à-vis de toutes autres variétés (les marqueurs microsatellites sont donnés dans la 1ère colonne).

Tableau 1

| Locus | Chr | Taille sur IR 36 | référence | IR36 | Gigante | IR64 | Azucena | TOG 568113 |
|-------|-----|------------------------|-----------|------|---------|------|---------|------------|
| RM001 | 1 | 113 | (2) | n | n-26 | n | n-22 | n-26 |
| RM005 | 1 | 113 | (2) | n | n-6 | n-4 | n+16 | n-8 |
| RM011 | 7 | 140 | (2) | n | n-4 | n | n-24 | n-16 |
| RM018 | 7 | 157 | (2) | n | n+4 | n+6 | n+8 | n-6 |
| RM019 | 12 | 226 | (2) | n | n | n+21 | n-9 | n-21 |
| RM021 | 11 | 157 | (2) | n | n+8 | n | n-14 | n-32 |
| RM148 | 3 | 129 | (3) | n | n+6 | n | n | n+6 |
| RM167 | 11 | 128 | (3) | n | n+4 | n | n+32 | n+24 |
| RM168 | 3 | 116 | (3) | n | n-20 | n | n-20 | n-24 |
| RM232 | 3 | 158 | (1) | n | n-14 | n | n-12 | n-16 |
| RM022 | 3 | 194 | (2) | n | n-2 | n | n-4 | n-2 |
| RM252 | 4 | 216 | (1) | n | n+38 | n+2 | n-20 | n+10 |
| RM255 | 4 | 144 | (1) | n | n | n | n | n |
| RM246 | 1 | 116 | (1) | n | n-12 | n-12 | n-16 | n-12 |
| RM231 | 3 | 182 | (1) | n | n+6 | n-22 | n-4 | n-12 |

Exemple 2 : Caractérisation de la résistance

La résistance a été caractérisée à partir de l'inoculation artificielle de jeunes plantules avec du virus comparativement à une variété témoin IR64 extrêmement sensible.

5 Le contenu en virus a été suivi pendant 60 jours après inoculation grâce à des tests ELISA sur les dernières feuilles émises.

Ces tests n'ont jamais pu mettre en évidence de signal significativement différent de plantes témoins non inoculées par le virus.

Une autre expérimentation a été réalisée en inoculant des protoplastes isolés des deux variétés Tog5681 et Gigante. Dans les deux cas, il est possible de détecter la présence des protéines virales (protéine de la capside et protéine de mouvement P1), ainsi que l'accumulation d'ARN viral, qui témoignent de la capacité de ces protoplastes à multiplier le virus, et ceci de la même manière que les protoplastes de variétés sensibles comme IR64.

15 Ainsi, si on considère que la réplication, le mouvement de cellule à cellule, et le transport à longue distance à travers les vaisseaux, sont les trois étapes principales du déroulement du cycle infectieux dans la plante, la résistance de ces deux variétés réside le plus logiquement dans un blocage du virus au niveau des cellules infectées.

20 Exemple 3 : Génétique de la résistance

Différents croisements F1 ont été réalisés entre la variété d'*O. sativa* résistante (Gigante), une variété d'*O. glaberrima* résistante Tog5681 (également identifiée par l'ADRAO) et la variété de référence très sensible IR64 (sélectionnée à l'IRRI).

25 La culture du matériel végétal, les croisements et la production des descendance ont été réalisés dans les serres de l'IRD à Montpellier.

Les hybrides F1 obtenus entre les variétés sensibles et résistantes ont été testés pour la résistance au virus du RYMV par test ELISA et suivi des symptômes.

5 Ces hybrides F1 se sont tous révélés aussi sensibles que le parent sensible et ont donc montré que la nature de la résistance était récessive.

En revanche, les hybrides entre les deux sources de résistance Gigante et Tog5681 n'ont donné que des hybrides F1 résistants en faveur d'un seul et unique locus de résistance chez ces deux sources de résistance.

Ces résultats sont résumés dans le tableau 2 ci-après.

10 Ce tableau donne la distribution des réponses ELISA (A 405 nm) dans les feuilles infectées par voie systémique des hybrides F1, des backcross et des descendants F2 obtenus à partir des backcross entre la variété IR64 sensible et les 2 cultivars résistants Gigante et Tog5681.

En ce qui concerne Gigante, l'hérédité de la résistance a été confirmée par un test de résistance sur 55 familles F3 du croisement (IR64 x Gigante). Les résultats sont donnés dans le tableau 3.

Ce tableau donne la ségrégation de la résistance à RYMV dans les descendance F3 (IR64 x Gigante). L'inoculation est effectuée 10 à 17 jours après la germination avec l'isolat du Burkina Faso et les symptômes sont suivis 45 jours après l'inoculation.

Tableau 3

| Classes de résistance | Nombre de descendances | Nombre de plantes ¹ | | Fréquence des plantes résistantes |
|-------------------------------|---------------------------|--------------------------------|--------------------|--------------------------------------|
| | | Total | Sensible Résistant | |
| Sensible en ségrégation | 15 | 191 | 191 | 0 |
| | 30 | 343 | 262 | 0,24 |
| | | | | $\chi^2 = 0,07 (3:1)$ |
| Résistant très résistant | 4 | 45 | 14 | 0,69 |
| | 6 | 87 | 0 | 1 |
| Résistant* très résistant* | 7 | 73 | 23 | 0,68 |
| | 4 | 56 | 0 | 1 |

* descendances F3 dérivées de plantes résistantes F2 analysées par tests ELISA

Réaction de digestion (25 µl) :

- 5 µl d'ADN (50 ng/ml)
- 0,2 µl (2 U) de EcoRI (10 U/µl)
- 0,2 µl (2 U) de MseI (5 U/µl)
- 5 µl de tampon T4 ligase 5X
- 14,5 µl de H₂O.

La réaction de digestion s'effectue pendant deux heures à 37°C, puis 15 min. à 70°C pour inactiver les enzymes de restriction. Après digestion, il est procédé à une réaction de ligation.

Réaction de ligation (50 µl) :

- 25 µl du milieu réactionnel de double digestion
- 1 µl d'adaptateur EcoRI
- 1 µl d'adaptateur MseI
- 5 µl de tampon T4 Ligase 5X
- 1 µl (1 U) de ligase (10 U/µl)
- 17 µl H₂O.

La réaction de ligation s'effectue à 37°C, pendant 3 heures, suivie d'une inactivation de l'enzyme à 60°C pendant 10 min.

c - Amplification

- L'amplification proprement dite a été réalisée en deux étapes : préamplification et amplification spécifique.

C1 - Réaction de pré amplification (50 µl)

- 5 µl du milieu réactionnel renfermant l'ADN digéré et fixé aux adaptateurs, dilué au 1/10
- 0,5 µl d'amorce EcoRI (150 ng/µl)
- 0,5 µl d'amorce MseI (150 ng/µl)
- 2 µl de mélange de nucléotides 5 mM
- 5 µl de tampon 10 X, Promega

5 µl de MgCl₂ 25 mM
0,2 µl (1 U) de Taq polymérase (5 U/µl)
31,8 µl de H₂O.

Les caractéristiques de la pré-amplification par PCR sont les suivantes :

5 20 cycles avec dénaturation : 30 sec à 94°C
 hybridation : 30 sec à 56°C
 élongation : 1 min à 72°C

L'amplification sélective se fait à partir d'un aliquote de la première
amplification diluée au 1/30 en utilisant des amorces ayant 3 nucléotides sélectifs
10 à l'extrémité 3', et en marquant l'une des amorces pour révéler les bandes sur un
film autoradiographique.

On utilise les couples d'amorces suivants :

E-AAC/M-CAG
E-ACC/M-CAG
15 E-AGC/M-CAG,
dans lesquels
E répond à la séquence
GAC TGC GTA CCA ATT C (SEQ ID N°1), et
M à la séquence
20 GAT GAG TCC TGA GTA A (SEQ ID N° 2).

La température d'hybridation est diminuée de 0,7°C par cycle, pendant les 11
cycles suivants :

20 derniers cycles dénaturation : 30 sec à 90°C
 hybridation : 30 sec à 56°C
25 élongation : 1 min à 72°C

On procède au marquage de l'amorce EcoRI (ramené à un tube de 0,5 µl) :

0,18 µl de l'amorce EcoRI (5ng)

0,1 µl de $\gamma^{33}\text{P}$ ATP (10 mCi/µl)
0,05 µl de tampon kinase 10 X
0,02 µl (0,2U) de T4 polymérase kinase (10U/µl)
0,15 µl de H_2O .

5 La réaction de marquage se fait à 37°C pendant 1 heure et est
arrêtée par 10 minutes à 70°C.

C2 - Réaction d'amplification spécifique

(20 µl) :

0,5 µl d'amorce EcoRI marquée
10 5 µl du milieu réactionnel de pré-amplification, dilué au 1/30,
0,3 µl d'amorce MseI (100 ng/µl)
0,8 µl de mélange de nucléotides 5 mM
2 µl de tampon 10 X Promega
2 µl de MgCl_2 25 mM
15 0,1 µl (0,5 U) de Taq polymérase (5 U/µl)
9,3 µl de H_2O .

Les caractéristiques de l'amplification sont les suivantes :

32 cycles avec

. pour le premier cycle :

20 dénaturation : 30 sec à 94°C
hybridation : 30 sec à 65°C
élongation : 1 min à 72°C

. les 11 cycles suivants : les mêmes conditions que précédemment, avec
diminution à chaque cycle de 0,7°C de la température d'hybridation ; et pour

25 . les 20 derniers cycles :

dénaturation : 30 sec à 90°C
hybridation : 30 sec à 56°C
élongation : 1 min à 72°C

d - Electrophorèse et Autoradiographie

A la fin de la réaction d'amplification, 20 µl de tampon de charge sont ajoutés (98 % de formamide, 0,005 % de xylène cyanol et 0,005 % de bleu de bromophénol). Les produits d'amplification sont séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant (6 % d'acrylamide, 8 M d'urée) avec un tampon de migration TBE (Tris 18 mM, EDTA 0,4 mM, acide borique 18 mM, pH 8,0) pendant 3 heures de migration à puissance de 50 watts. Après migration, le gel est fixé dans une solution 1V d'acide acétique/2V d'éthanol absolu pendant 20 minutes. Le gel est transféré sur un papier Wattman 3M et séché pendant 45 minutes à 80°C avec un sécheur de gel. Le gel est placé dans une cassette avec un film ultrasensible. L'autoradiographie est révélée après deux jours d'exposition. La comparaison des profils obtenus chez les parents et les pools de plantes sensibles ou résistantes permet d'identifier des bandes présentes dans l'un des pools, mais absentes dans l'autre. Ces bandes candidates au marquage de la résistance sont ensuite vérifiées individuellement sur chacune des plantes composant les pools d'ADN.

e - Résultats

L'étude des résultats obtenus montre que les deux marqueurs appelés M1 et M2 sont présents chez le parent sensible (IR64) ainsi que dans toutes les plantes F2 (IR64 x Gigante) composant le pool de plantes sensibles, alors que cette bande est absente chez le parent résistant (Gigante) et qu'un seul individu du pool résistant manifeste cette bande. Le même type de variation est observé dans le recroisement (IR64 x Tog5681) x Tog5681. Les autres marqueurs identifiés dans cette analyse (M3 à M6) montrent aussi la même variation:

- présence des bandes chez le parent sensible et le pool des plantes sensibles F2 (IR64 x Gigante) ainsi que les plantes sensibles du recroisement (IR64 x Tog5681) x Tog5681.

5 - absence de bande chez les parents résistants Gigante et Tog5681, chez le pool des plantes résistantes F2 (IR64 x Gigante) et chez les plantes résistantes du recroisement (IR64 x Tog5681) x Tog5681.

10 Les données de ségrégation entre les marqueurs AFLP M1 à M6 et le locus de résistance pour les pools F2 (IR64 x Gigante) et le backcross interspécifique (IR64 x Tog5681) x Tog5681 sont résumées dans les tableaux 4 et 5. L'analyse des données de ségrégation et des rares recombinants observés dans
les deux croisements permet d'évaluer les taux de recombinaison entre ces
différents marqueurs et le locus de résistance. En particulier, les marqueurs M1
d'une part et les marqueurs M2 à M6 d'autre part déterminent un segment
inférieur à 10-15 cM portant le locus de résistance. M1 et M2 sont ainsi à moins
15 de 5-10 cM et placés de part et d'autre de ce locus.

TABLEAU 4

| Résistance/Marqueur M1 | | Nombre d'individus observés | | | | | |
|------------------------------------|--------------|-----------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|---|
| Phénotype | | Résistant | | | Sensible | | |
| Génotype résistance RYMV | <i>tt/gg</i> | <i>tt</i> | <i>gg</i> | <i>It</i> | <i>It</i> | <i>It</i> | |
| Marqueur AFLP | -/- | +/- | +/ | -/- | +/- | -/- | |
| | | | | +/ | | | |
| Pool F2 résistant (IR64 x gigante) | 10 | - | 1 | - | - | - | - |
| Pool F2 sensible (IR64 x gigante) | - | - | - | - | - | 0 | - |
| | | | 10 | | | | |
| Backcross interspécifique Tog5681 | 11 | 1 | - | 0 | 8 | - | - |

| Résistance/Marqueur M2,M3,M4,M6 | | Nombres d'individus observés | | | | | |
|------------------------------------|--------------|------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Phénotype | | Résistant | | | Sensible | | |
| Génotype résistance RYMV | <i>tt/gg</i> | <i>tt</i> | <i>gg</i> | <i>It</i> | <i>It</i> | <i>II</i> | <i>II</i> |
| Marqueur AFLP | -/- | +/- | +/ | -/- | +/- | -/- | +/ |
| Pool F2 résistant (IR64 x gigante) | 11 | - | 0 | - | - | - | - |
| Pool F2 sensible (IR64 x gigante) | - | - | - | - | - | 0 | 10 |
| Backcross interspécifique Tog5681 | 10 | 2 | - | 0 | 8 | - | - |

| Résistance/Marqueur M5 | | Nombre d'individus observés | | | | |
|------------------------------------|--------------|-----------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Phénotype | | Résistant | | | Sensible | |
| Génotype résistance RYMV | <i>tt/gg</i> | <i>tt</i> | <i>gg</i> | <i>It</i> | <i>It</i> | <i>II</i> |
| Marqueur AFLP | -/- | +/- | +/ | -/- | +/- | -/- |
| | | | | +/ | | |
| Pool F2 résistant (IR64 x gigante) | 11 | - | - | - | - | - |
| | 0 | | | - | | |
| Pool F2 sensible (IR64 x gigante) | - | - | - | - | - | 0 |
| | - | | | 10 | | |
| Backcross interspécifique Tog5681 | 9 | 3 | 0 | 8 | - | - |
| | - | | | - | | |

TABLEAU 5

| Marqueur M1/Marqueurs M2,M3,M4,M6 | Nombre d'individus observés | | | |
|------------------------------------|-----------------------------|-----|-----|-----|
| Génotype M1 | -/* | +/* | -/- | -/- |
| Génotype M2,M3,M4,M6 | +/* | -/- | +/* | -/- |
| Pool F2 résistant (IR64 x gigante) | 0 | 1 | 0 | 10 |
| Pool F2 sensible (IR64 x gigante) | 10 | 0 | 0 | 0 |
| Backcross interspécifique Tog5681 | 11 | 2 | 2 | 11 |

| Marqueur M1/Marqueur M5 | Nombres d'individus observés | | | |
|------------------------------------|------------------------------|-----|-----|-----|
| Génotype M1 | -/* | +/* | -/- | -/- |
| Génotype M5 | +/* | -/- | +/* | -/- |
| Pool F2 résistant (IR64 x gigante) | 0 | 1 | 0 | 10 |
| Pool F2 sensible (IR64 x gigante) | 10 | 0 | 0 | 0 |
| Backcross interspécifique Tog5681 | 11 | 2 | 3 | 10 |

| Marqueur M5/Marqueurs M2,M3,M4,M6 | Nombre d'individus observés | | | |
|------------------------------------|-----------------------------|-----|-----|-----|
| Génotype M5 | +/* | +/* | -/- | -/- |
| Génotype M2,M3,M4,M6 | +/* | -/- | +/* | -/- |
| Pool F2 résistant (IR64 x gigante) | 0 | 0 | 0 | 11 |
| Pool F2 sensible (IR64 x gigante) | 10 | 0 | 0 | 0 |
| Backcross interspécifique Tog5681 | 13 | 1 | 0 | 12 |

* : (-) backcross interspécifique Tog5681.(+ ou-) pool F2

Exemple 5 : Isolement du marqueur M1

Une nouvelle amplification, avec le même couple d'amorces, a été réalisée, suivie d'une migration sur gel de polyacrylamide dans les mêmes conditions que celles énoncées ci-dessus. La révélation a été faite par une coloration au nitrate d'argent, avec le kit silver staining (Promega), pour visualiser directement les bandes sur le gel. Après révélation, la bande M1 a été excisée du gel, puis l'ADN a été élué dans 50 µl d'eau à 4°C pendant une nuit.

Un aliquot de 5 µl a été prélevé et réamplifié avec les mêmes couples d'amorces avec un marquage au P³³. Le produit d'amplification a été séparé à nouveau sur gel d'acrylamide dénaturant à 6%, et comparé aux parents et aux pools sensibles et résistants. La piste correspondant à ce produit d'amplification montre une seule bande de 510 pb migrant exactement au même niveau que la bande d'origine qui avait été excisée. Un autre aliquot de 5 µl a été également amplifié avec les mêmes amorces et a été séparé sur gel d'agarose à 1,8%. La bande correspondant à la taille attendue (510pb) a été à nouveau excisée et purifiée avec un kit gene clean (Promega).

Exemple 6 : Clonage et Séquençage du Marqueur M1

. clonage

3 µl du produit de purification ont été utilisés pour une réaction de clonage pendant une nuit à 37°C.

3 µl de produit de purification

1 µl de vecteur PGEMTeasy

1 µl de T4 Tampon ligase 10 X

1 µl de T4 DNA Ligase

4 µl de H₂O

La transformation a été réalisée avec la souche *E. Coli* JM109 en ajoutant 5 µl du produit de clonage à 100 µl de cellules compétentes de *E. Coli* JM109. Une préculture a été réalisée sur milieu de culture LB pendant 1 heure, à 37 °C. Ensuite les bactéries ont été étalées sur boîte de Pétri contenant de l'agar à 1/1000 d'ampicilline. 50 µl d'IPTG-XGal sont ajoutés juste avant l'étalement des bactéries pour sélectionner les bactéries transformées. Une colonie blanche (transformée) a été sélectionnée et remise en culture dans les mêmes conditions (Agar plus ampicilline).

A partir de cette culture, une mini-préparation d'ADN plasmidique a été réalisée avec le kit Wizard plus (Promega). L'ADN plasmidique contenant l'insert a été digéré avec l'enzyme EcoRI pour vérifier la présence du marqueur M1. Un gel d'agarose à 1,8% a permis de vérifier la présence de la bande de 3 kb correspondant au plasmide et de la bande de 510 pb correspondant au marqueur M1 (photo 1).

Séquençage

La séquence de l'insert (SEQ ID N° 3) est la suivante (5', 3') :

SEQ ID N° 3

| | | | | | | |
|----|---|----|----|----|----|----|
| 20 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 |
| | GTGCTTGCTTATAGCACTACAGGAGAAGGAAGGGGAACACAACAGCC | | | | | |
| | ATGGCGAGCGAAGGTTCAACGTCGGAGAAACAGGCTGCGACGGGCAG | | | | | |
| | CAAGGTGCCGGCGGCGGATCGGAGGAAGGAAAAGGAGGAAATCGAA | | | | | |
| | GTTATGCTGGAGGGGCTTGACCTAAGGGCAGATGAGGAGGAGGATGT | | | | | |
| 25 | GGAATTGGAGGAAGATCTAGAGGAGCTTGAGGCAGATGCAAGATGGC | | | | | |
| | TAGCCCTAGCCACAGTTCATACGAAGCGATCGTTTAGTCAAGGGGCTT | | | | | |
| | TCTTTGGGAGTATGCGCTCAGCATGGAAGTGCAGCGAAAGAAGTAGATT | | | | | |
| | TCAGAGCAATGAAAGACAATCTGTTCTCGATCCAATTCAATTGTTTGG | | | | | |
| | GGGATTGGGAACGAGTTATGAATGAAGGTCCATGGACCTTTTCGAGGAT | | | | | |
| 30 | GTTTCGGTGCTCCTCGCAGAAATATGATGGCTGGTCCAAGATTGAAT | | | | | |

Les séquences correspondant aux amorces utilisées pour les amplifications AFLP ont été retrouvées et montrent que la bande correspond à un fragment de restriction (EcoRI - MseI).

En déduisant les séquences correspondant aux amorces, la taille réelle du
5 fragment d'ADN de riz cloné est de 471 pb.

L'utilisation des différents couples d'amorces (1-3), (1-4), (1-5) d'une part et (2-3), (2-4), (2-5) d'autre part permet de valider le clonage de la bande AFLP M1. L'amplification de l'ADN des variétés utilisées dans les croisements avec ces amorces ne montre qu'une seule bande. Le fragment correspondant à la variété
10 Tog56581 est un peu plus important que celui des autres variétés (fig. 2).

Exemple 7 : Transformation de la séquence M1 en marqueur polymorphe

Un polymorphisme pour le marqueur M1 a été déterminé entre les parents de la population haploïde doublée (IR64 x Azucena). Cette population compte
15 plus de 300 marqueurs répartis sur les 12 chromosomes du riz. Pour cela, on s'est appuyé sur les sites de restriction de la séquence du marqueur M1 déterminée sur le parent IR64 (fig. 3). Les amorces (1-3), (1-4) et (1-5) ont été utilisés pour amplifier l'ADN des parents des croisements qui a ensuite été digéré par des enzymes de restriction. Le site de restriction HpaII/MspI libère un fragment de 86
20 pb lorsque l'amorce 1 est utilisée. Ce site est absent chez les variétés Gigante et Azucena. (fig. 4).

Le marqueur a été testé sur les individus F2 du pool sensible et du pool résistant du croisement (IR64 x Gigante). Tous les individus résistants ont le profil de la variété Gigante (absence du marqueur AFLP M1 associée à l'absence
25 du site de restriction HpaII/MspI) à l'exception de l'individu (5.11). Les individus sensibles présentent le site de restriction HpaII/MspI à l'état homozygote comme

la variété IR64 à l'exception de deux individus hétérozygotes qui sont recombinés (fig. 5).

La séquence du marqueur M1 que l'on peut amplifier par des amorces spécifiques correspond bien au marqueur AFLP M1. La digestion par l'enzyme HpaII/MspI permet de distinguer l'allèle venant du parent sensible (IR64) du parent résistant (Gigante).

Ces nouvelles données permettent de conforter la position du locus de résistance entre les marqueurs M1 et M2 et d'estimer les taux de recombinaison à $0,065 \pm 0,045$ pour la distance entre M1 et le locus de résistance et $0,11 \pm 0,047$ pour la distance entre les marqueurs M1 et M2.

Exemple 8 : Cartographie du marqueur M1

Soixante individus de la population (IR 64 x Azucena) ont été passés pour le marqueur M1 : amplification avec les amorces (1-3) et digestion par l'enzyme HpaII/MspI, suivie d'une séparation des fragments sur un gel d'agarose à 2,5 %. La ségrégation du marqueur M1 est sans distorsion (fig. 6). Les résultats permettent de cartographier le marqueur M1 en utilisant un logiciel de cartographie (Mapmaker V3), qui permet de placer le marqueur M1 sur le chromosome 4 entre les marqueurs RG 163 et RG 214 (fig. 7). Cet intervalle représente la zone où se situe le locus de résistance au RYMV.

La cartographie du gène de résistance au RYMV sur le chromosome 4 de la carte génétique du riz permet d'identifier des marqueurs plus proches du locus de résistance. Il s'agit en particulier de marqueurs microsatellites RM252 et RM273 ou tout autre marqueur à l'intérieur de l'intervalle (4-5cM) défini par ces marqueurs permettant d'identifier un polymorphisme entre les parents IR64 et Gigante tel que les marqueurs RFLP issus de banques génomiques ou d'ADNc, les microsatellites, les marqueurs AFLP ou les marqueurs dérivés de la

cartographie physique de la région comme les clones BAC, YAC ou leurs cosmides.

Les marqueurs identifiés conformément à l'invention ou tout autre marqueur situé dans cet intervalle permettant d'identifier un polymorphisme entre
5 des variétés résistantes tel que Gigante ou *O. glaberrima* avec des variétés de riz sensibles au RYMV peuvent être utilisés pour le transfert de la résistance au RYMV dans des variétés sensibles par croisement successifs suivis de sélection assistée par marqueurs.

10 Exemple 9 : Marquage du locus de résistance de la variété Tog5681

La présence du site de restriction HpaII/MspI dans la variété Tog5681 ne permet pas d'utiliser la stratégie de l'exemple 8 pour vérifier que le marqueur M1 est aussi un marqueur de la résistance provenant de Tog5681. Aussi, les 4
15 variétés Azucena, Gigante, IR64 et Tog5681 ont été digérées avec 12 enzymes de restriction (BamHI, BglII, DraI, EcoRI, EcoRV, HindIII, ApaI, KpnI, PstI, ScaI, XbaI, HaeIII) pour identifier un polymorphisme de restriction en utilisant la séquence d'ADN du marqueur M1 comme sonde. L'enzyme ScaI permet d'identifier un polymorphisme entre IR64 et Tog5681 (fig. 8). Ce polymorphisme a été utilisé pour valider le marqueur M1 sur un croisement (IR64 x Tog5681) x
20 IR64 en ségrégation pour la résistance. 5 individus sensibles de ce croisement ont été testés et montrent tous la bande caractéristique d'IR64. Les 9 individus résistants ne montrent que la bande de Tog5681 à l'exception d'un seul qui est recombinant (fig. 9). Le polymorphisme de restriction mis en évidence par l'enzyme ScaI en utilisant le marqueur M1 comme sonde est donc bien lié au
25 locus de résistance de Tog5681. L'analyse génétique et l'identification de marqueurs de résistance sont cohérentes pour considérer que le marqueur M1

cartographie bien le même locus de résistance chez les deux variétés Gigante et Tog5681.

5

Exemple 10 : Clonage et séquençage du marqueur M2 en marqueur PCR-spécifique

La bande AFLP obtenue avec le couple d'amorces E-ACC/M-CAG et correspondant à la bande M2 visible chez le parent sensible (IR64) et présente
10 chez tous les individus composant le pool sensible a été clonée suivant le même protocole que pour le marqueur M1. La séquence correspondant à cette bande a été déterminée et 3 amorces ont été définies (1 forward - 2 reverse) pour permettre la transformation de ce marqueur en marqueur PCR-spécifique.

Séquence du marqueur M2 (120pb) (SEQ ID N°9) :

15

AATTCACCCC ATGCCCTAAG TTAGGACGTT CTCAGCTTAG
TGGTGTGGTA GCTTTTCTA TTTTCCTAAG CACCCATTGA
AGTATTTTGC ATTGGAGGTG GCCTTAGGTT TGCCTCTGTTA

20 Amorces :

(SEQ ID N°10) : AACCTAAGGCCACCTCCAAT (droite)

(SEQ ID N°11) : GCAAACCTAAGGCCACCTC (droite)

(SEQ ID N°12) : ATTCACCCCATGCCCTAAG (gauche)

25 Les conditions suivantes sont utilisées pour amplifier simultanément les marqueurs M1 et M2

- tampon 10X Proméga 1,5 µl
- MgCl₂ Proméga 1,5 µl

| | | |
|---|-----------------------|---------|
| | - dNTP (5 mM) | 0,6 µl |
| | - amorce M1-1 (10 µM) | 0,15 µl |
| | - amorce M1-4 (10 mM) | 0,15 µl |
| | - amorce M2-1 (10 mM) | 0,15 µl |
| 5 | - amorce M2-2 (10 mM) | 0,15 µl |
| | - H ₂ O | 7,74 µl |
| | - Taq Polymerase | 0,06 µl |
| | - ADN (5 ng/µl) | 3 µl |

10 Programme PCR

- 5mn à 94°C
- 1mn à 94°C
- 30 s à 59°C
- 1 mn à 72°C
- 15 - 35 cycles
- 5 mn à 72°C
- 10 mn à 4°C

20 Le marqueur M2 peut être amplifié seul avec une température d'hybridation de 60.5°C, les autres paramètres restant inchangés. Dans ces conditions d'amplification, le marqueur M2 apparaît comme un marqueur dominant se caractérisant par une présence de bande chez le parent sensible (IR64) et absence de bande chez le parent (Gigante).

25 **Exemple 11** : Création d'une population de plantes résistantes recombinantes entre les marqueurs M1 et M2 pour ordonner à l'intérieur de cet intervalle les marqueurs AFLP candidats au marquage de la résistance 750

individus F2 (IR64 x Gigante) ont été inoculés artificiellement avec le virus RYMV (souche BF1). Les plantes sans symptômes ont été repiquées en serre soit 188 individus. Par la suite, des tests complémentaires basés sur des tests Elisa et des tests de descendance ont permis d'éliminer une dernière fraction de 50
5 plantes sensibles. Les 138 plantes restantes et homozygotes pour la résistance ont été systématiquement génotypées pour les deux marqueurs M1 et M2 comme précédemment définis. 45 individus ont été ainsi sélectionnés (38 recombinants par rapport à M1 ; 7 recombinants par rapport à M2) et 2 doubles recombinants. Ces individus recombinants ont servi à l'ordonnancement des marqueurs AFLP
10 dans l'intervalle entre M1 et M2.

Ces résultats sont résumés dans le tableau 6 suivant :

TABLEAU 6

**Sélection d'une sous-population F2 (IR64 x Gigante) recombinante dans
l'intervalle des marqueurs M1-M2**

| Etapés réalisées F2 (IR64 x Gigante) | Nombre de plantes | % |
|---|----------------------|------|
| Inoculation des plantes F2 (10 jours après semis) | 768 | |
| Transplantation en serre (5 semaines après inoculation) | 188 | |
| Elimination de plantes sensibles (suivi des symptômes – Test Elisa et Test de descendance) | 50 | |
| Sélection de plantes résistantes homozygotes pour le gène de résistance élevée | 138 | 17,9 |
| Génotypage des individus sélectionnés pour les marqueurs M1 et M2 | | |
| Plantes recombinées par rapport à M1 | 36 | 18,8 |
| Plantes recombinées par rapport à M1 et M2 | 2 | 1,4 |
| Plantes recombinées par rapport à M2 | 7 | 5,1 |

5

Exemple 12 : Criblage de marqueurs AFLP pour sélectionner de nouveaux
marqueurs candidats à la résistance

Un total de 328 couples d'amorces EcoRI/MseI, chacun défini par 3
nucléotides, a été utilisé suivant le protocole précédemment défini. Ces amorces
sont données dans le tableau 7 ci-après.

10

TABLEAU 7

| N° de combinaison | Amorce EcoRI | Amorce MseI | N° de combinaison | Amorce EcoRI | Amorce MseI | N° de combinaison | Amorce EcoRI | Amorce MseI |
|----------------------|-----------------|----------------|----------------------|-----------------|----------------|----------------------|-----------------|----------------|
| 1 | AAC | CAA | 55 | ACA | CTG | 109 | ACG | AGG |
| 2 | AAC | CAC | 56 | ACA | CTT | 110 | ACG | AGT |
| 3 | AAC | CAG | 57 | ACA | AAC | 111 | ACT | CAA |
| 4 | AAC | CAT | 58 | ACA | AAG | 112 | ACT | CAC |
| 5 | AAC | CCA | 59 | ACA | AAT | 113 | ACT | CAG |
| 6 | AAC | CCT | 60 | ACA | ACA | 114 | ACT | CAT |
| 7 | AAC | CGA | 61 | ACA | ACC | 115 | ACT | CCA |
| 8 | AAC | CGT | 62 | ACA | ACG | 116 | ACT | CCT |
| 9 | AAC | CTA | 63 | ACA | ACT | 117 | ACT | CGA |
| 10 | AAC | CTC | 64 | ACA | AGC | 118 | ACT | CGT |
| 11 | AAC | CTG | 65 | ACA | AGG | 119 | ACT | CTA |
| 12 | AAC | CTT | 66 | ACA | AGT | 120 | ACT | CTC |
| 13 | AAC | AAC | 67 | ACC | CAA | 121 | ACT | CTG |
| 14 | AAC | AAG | 68 | ACC | CAC | 122 | ACT | CTT |
| 15 | AAC | AAT | 69 | ACC | CAG | 123 | ACT | AAC |
| 16 | AAC | ACA | 70 | ACC | CAT | 124 | ACT | AAG |
| 17 | AAC | ACC | 71 | ACC | CCA | 125 | ACT | AAT |
| 18 | AAC | ACG | 72 | ACC | CCT | 126 | ACT | ACA |
| 19 | AAC | ACT | 73 | ACC | CGA | 127 | ACT | ACC |
| 20 | AAC | AGC | 74 | ACC | CGT | 128 | ACT | ACG |
| 21 | AAC | AGG | 75 | ACC | CTA | 129 | ACT | ACT |
| 22 | AAC | AGT | 76 | ACC | CTC | 130 | ACT | AGC |
| 23 | AAG | CAA | 77 | ACC | CTG | 131 | ACT | AGG |
| 24 | AAG | CAC | 78 | ACC | CTT | 132 | ACT | AGT |
| 25 | AAG | CAG | 79 | ACC | AAC | 133 | AGA | CAA |
| 26 | AAG | CAT | 80 | ACC | AAG | 134 | AGA | CAC |
| 27 | AAG | CCA | 81 | ACC | AAT | 135 | AGA | CAG |
| 28 | AAG | CCT | 82 | ACC | ACA | 136 | AGA | CAT |
| 29 | AAG | CGA | 83 | ACC | ACC | 137 | AGA | CCA |
| 30 | AAG | CGT | 84 | ACC | ACG | 138 | AGA | CCT |
| 31 | AAG | CTA | 85 | ACC | ACT | 139 | AGA | CGA |
| 32 | AAG | CTC | 86 | ACC | AGC | 140 | AGA | CGT |
| 33 | AAG | CTG | 87 | ACC | AGG | 141 | AGA | CTA |
| 34 | AAG | CTT | 88 | ACC | AGT | 142 | AGA | CTC |
| 35 | AAG | AAC | 89 | ACG | CAA | 143 | AGA | CTG |
| 36 | AAG | AAG | 90 | ACG | CAC | 144 | AGA | CTT |
| 37 | AAG | AAT | 91 | ACG | CAG | 145 | AGA | AAC |
| 38 | AAG | ACA | 92 | ACG | CAT | 146 | AGA | AAG |
| 39 | AAG | ACC | 93 | ACG | CCA | 147 | AGA | AAT |
| 40 | AAG | ACG | 94 | ACG | CCT | 148 | AGA | ACA |
| 41 | AAG | ACT | 95 | ACG | CGA | 149 | AGA | ACC |
| 42 | AAG | AGC | 96 | ACG | CGT | 150 | AGA | ACG |
| 43 | AAG | AGG | 97 | ACG | CTA | 151 | AGA | ACT |
| 44 | AAG | AGT | 98 | ACG | CTC | 152 | AGA | AGC |
| 45 | ACA | CAA | 99 | ACG | CTG | 153 | AGA | AGG |
| 46 | ACA | CAC | 100 | ACG | CTT | 154 | AGA | AGT |
| 47 | ACA | CAG | 101 | ACG | AAC | 155 | AGC | CAA |
| 48 | ACA | CAT | 102 | ACG | AAG | 156 | AGC | CAC |
| 49 | ACA | CCA | 103 | ACG | AAT | 157 | AGC | CAG |
| 50 | ACA | CCT | 104 | ACG | ACA | 158 | AGC | CAT |
| 51 | ACA | CGA | 105 | ACG | ACC | 159 | AGC | CCA |
| 52 | ACA | CGT | 106 | ACG | ACG | 160 | AGC | CCT |
| 53 | ACA | CTA | 107 | ACG | ACT | 161 | AGC | CGA |
| 54 | ACA | CTC | 108 | ACG | AGC | 162 | AGC | CGT |

en ombré : polymorphisme pour une ou plusieurs bandes entre les pools sensible et résistant

* : présence d'une ou plusieurs bandes polymorphes dans le pool sensible

** : présence d'une ou plusieurs bandes polymorphes dans le pool résistant

*** : présence d'une ou plusieurs bandes polymorphes dans le pool sensible et le pool résistant

TABLEAU 7 suite

| N° de combinaison | Amorce EcoRI | Amorce MseI | N° de combinaison | Amorce EcoRI | Amorce MseI | N° de combinaison | Amorce EcoRI | Amorce MseI |
|----------------------|-----------------|----------------|----------------------|-----------------|----------------|----------------------|-----------------|----------------|
| 163 | AGC | CTA | 218 | AGT | AGC | 273 | CAT | CTA |
| 164 | AGC | CTC | 219 | AGT | AGG | 274 | CAT | CTC |
| 165 | AGC | CTG | 220 * | AGT | AGT | 275 | CAT | CTG |
| 166 | AGC | CTT | 221 | ATC | CAA | 276 | CAT | CTT |
| 167 | AGC | AAC | 222 | ATC | CAC | 277 | CAT | AAC |
| 168 | AGC | AAG | 223 | ATC | CAG | 278 | CAT | AAG |
| 169 | AGC | AAT | 224 | ATC | CAT | 279 | CAT | AAT |
| 170 | AGC | ACA | 225 | ATC | CCA | 280 * | CAT | ACA |
| 171 | AGC | ACC | 226 | ATC | CCT | 281 | CAT | ACC |
| 172 | AGC | ACG | 227 | ATC | CGA | 282 | CAT | ACG |
| 173 | AGC | ACT | 228 | ATC | CGT | 283 | CAT | ACT |
| 174 ** | AGG | AGG | 229 | ATC | CTA | 284 | CAT | AGC |
| 175 ** | AGG | AGG | 230 | ATC | CTC | 285 | CAT | AGG |
| 176 | AGG | AGT | 231 | ATC | CTG | 286 | CAT | AGT |
| 177 | AGG | CAA | 232 | ATC | CTT | 287 * | CTA | CAA |
| 178 | AGG | CAC | 233 ** | ATC | ACC | 288 | CTA | CAC |
| 179 | AGG | CAG | 234 ** | ATC | AAG | 289 | CTA | CAG |
| 180 | AGG | CAT | 235 * | ATC | AAT | 290 | CTA | CAT |
| 181 | AGG | CCA | 236 | ATC | ACA | 291 * | CTA | CCA |
| 182 | AGG | CCT | 237 | ATC | ACC | 292 | CTA | CCT |
| 183 | AGG | CGA | 238 | ATC | ACG | 293 | CTA | CGA |
| 184 | AGG | CGT | 239 | ATC | ACT | 294 | CTA | CGT |
| 185 | AGG | CTA | 240 | ATC | AGC | 295 | CTA | CTA |
| 186 | AGG | CTC | 241 | ATC | AGG | 296 | CTA | CTC |
| 187 | AGG | CTG | 242 | ATC | AGT | 297 * | CTA | CTG |
| 188 | AGG | CTT | 243 | CAA | CAA | 298 | CTA | CTT |
| 189 | AGG | AAC | 244 | CAA | CAC | 299 | CTA | AAC |
| 190 | AGG | AAG | 245 | CAA | CAG | 300 | CTA | AAG |
| 191 | AGG | AAT | 246 | CAA | CAT | 301 | CTA | AAT |
| 192 | AGG | ACA | 247 | CAA | CCA | 302 | CTA | ACA |
| 193 | AGG | ACC | 248 | CAA | CCT | 303 | CTA | ACC |
| 194 | AGG | ACG | 249 | CAA | CGA | 304 | CTA | ACG |
| 195 * | AGG | AGT | 250 ** | CAA | CGT | 305 | CTA | ACT |
| 196 | AGG | AGC | 251 | CAA | CTA | 306 | CTA | AGC |
| 197 ** | AGG | AGG | 252 | CAA | CTC | 307 | CTA | AGG |
| 198 | AGG | AGT | 253 | CAA | CTG | 308 | CTA | AGT |
| 199 | AGT | CAA | 254 * | CAA | CTT | 309 | CTT | CAA |
| 200 | AGT | CAC | 255 | CAA | AAC | 310 | CTT | CAC |
| 201 | AGT | CAG | 256 | CAA | AAG | 311 | CTT | CAG |
| 202 | AGT | CAT | 257 * | CAA | AAT | 312 ** | CTT | CAT |
| 203 | AGT | CCA | 258 ** | CAA | ACA | 313 | CTT | CCA |
| 204 | AGT | CCT | 259 | CAA | ACC | 314 | CTT | CCT |
| 205 | AGT | CGA | 260 | CAA | ACG | 315 | CTT | CGA |
| 206 | AGT | CGT | 261 | CAA | ACT | 316 | CTT | CGT |
| 207 | AGT | CTA | 262 | CAA | AGC | 317 | CTT | CTA |
| 208 | AGT | CTC | 263 | CAA | AGG | 318 * | CTT | CTC |
| 209 | AGT | CTG | 264 | CAA | AGT | 319 ** | CTT | CTG |
| 210 | AGT | CTT | 265 | CAT | CAA | 320 | CTT | CTT |
| 211 | AGT | AAC | 266 | CAT | CAC | 321 | CTT | AAC |
| 212 | AGT | AAG | 267 | CAT | CAG | 322 | CTT | AAG |
| 213 * | AGT | AAT | 268 | CAT | CAT | 323 | CTT | AAT |
| 214 | AGT | ACA | 269 | CAT | CCA | 324 | CTT | ACA |
| 215 ** | AGT | AGC | 270 | CAT | CCT | 325 | CTT | ACC |
| 216 | AGT | ACG | 271 | CAT | CGA | 326 | CTT | ACG |
| 217 | AGT | ACT | 272 * | CAT | CGT | 327 | CTT | ACT |
| | | | | | | 328 | CTT | AGT |

en ombré : polymorphisme pour une ou plusieurs bandes entre les pools sensible et résistant

* : présence d'une ou plusieurs bandes polymorphes dans le pool sensible

** : présence d'une ou plusieurs bandes polymorphes dans le pool résistant

Ce criblage a permis d'identifier une ou plusieurs bandes polymorphes selon leur apparition chez le parent sensible et/ou le parent résistant. 23 couples d'amorces ont permis d'identifier un polymorphisme entre les parents confirmés par les pools d'ADN F2 sensible ou résistant. Le tableau récapitule et donne la position dans l'intervalle M1-M2 des marqueurs AFLP liés au locus de résistance élevée au virus de la panachure jaune du riz.

TABLEAU 8

| N° de combinaison | Nucléotides variables | | Présence de(s) bande(s) | | Position des marqueurs sur l'intervalle M1-M2 |
|----------------------|-----------------------|-------------|-------------------------|----------------|--|
| | Amorce EcoRI | Amorce MseI | pool sensible | pool résistant | |
| 3 | AAC | CAG | + | - | = Marqueur cloné M1 |
| 69 | ACC | CAG | + | - | = Marqueur cloné M2 |
| 77 | ACC | CTG | - | + | non déterminé |
| 81 | ACC | AAT | - | + | non déterminé |
| 86 | ACC | AGC | - | + | non déterminé |
| 91 | ACG | CAG | - | + | non déterminé |
| 104 | ACG | ACA | + | - | entre R et Rm273 |
| 154 | AGA | AGT | + | + | au delà de M2 |
| 157 | AGC | CAG | + | + | en coségrégation avec M2 |
| 174 | AGC | AGC | - | + | non déterminé |
| 175 | AGC | AGG | + | + | entre M1 et Rm241 |
| 197 | AGG | AGG | + | + | entre M1 et Rm241 |
| 215 | AGT | ACC | - | + | non déterminé |
| 220 | AGT | AGT | + | - | entre Rm273 et M2 |
| 233 | ATC | AAG | + | + | entre M1 et Rm241 |
| 250 | CAA | CGT | - | + | non déterminé |
| 254 | CAA | CTT | + | - | au delà de M2 |
| 258 | CAA | ACA | + | - | entre M1 et Rm241 |
| 280 | CAT | ACA | + | - | au delà de M2 |
| 287 | CTA | CAA | + | - | entre Rm273 et M2 |
| 291 | CTA | CCA | + | - | entre M1 et Rm241 |
| 318 | CTT | CTC | + | + | entre Rm273 et M2 |
| 319 | CTT | CTG | - | + | non déterminé |

Après vérification individuelle sur chacun des individus composant les pools, les marqueurs candidats correspondant à des bandes présentes chez le parent IR64

peuvent être testées sur les recombinants identifiés dans l'exemple 11. 9 marqueurs ont été confirmés ainsi comme appartenant à l'intervalle M1 -M2. Le tableau 9 donne l'ordonnancement dans l'intervalle M1-M2 des marqueurs AFLP identifiés par comparaison de pools d'ADN sensible et résistant à partir d'une sous population résistante d'une F2 (IR64 x Gigante).

TABLEAU 9

| Individus résistants F2 (IR64 x Gigante) | M1 | E-AGG | E-ATC | E-CAA | E-AGC | E-CTA | Résist. | E-AGG | E-AGT | E-CTT | E-CTA | M2 | | |
|---|----|-------|-------|-------|-------|-------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | M-AGG | M-AAG | M-ACA | M-AGG | M-CCA | RM241 | RM252 | RYMV | M-ACA | RM273 | M-AGT | M-CTC | M-CAA |
| 2 | H | D | D | O | O | O | - | B | B | B | B | B | B | B |
| 7 | H | D | D | O | O | O | - | B | B | B | B | B | B | B |
| 8 | H | D | D | O | O | O | - | B | B | B | B | B | B | B |
| 10 | H | D | D | O | E | O | - | B | B | B | B | B | B | B |
| 21 | H | D | D | O | O | B | C | B | B | B | B | B | B | B |
| 23 | H | D | D | O | E | O | - | B | B | B | B | B | B | B |
| 25 | H | D | D | O | O | O | E | H | B | B | B | B | B | B |
| 29 | H | D | D | O | B | B | C | B | B | B | B | B | B | B |
| 37 | H | D | D | O | E | O | E | H | B | B | B | B | B | B |
| 48 | H | D | D | O | D | O | - | B | B | B | B | B | B | B |
| 55 | H | D | D | O | O | O | E | H | B | B | B | B | B | B |
| 61 | H | D | D | O | O | O | E | H | B | B | B | B | B | B |
| 65 | H | D | D | O | - | B | C | B | B | B | B | B | B | B |
| 95 | H | E | D | D | O | B | C | B | B | B | B | B | B | B |
| 103 | H | E | D | D | - | B | C | B | B | B | B | B | B | B |
| 104 | H | D | D | O | B | B | C | B | B | B | B | B | B | B |
| 109 | H | B | B | B | B | B | C | B | B | B | B | B | B | B |
| 111 | H | E | D | D | O | O | - | B | B | B | B | B | B | B |
| 119 | H | D | D | O | D | O | - | B | B | B | B | B | B | B |
| 120 | A | D | D | O | O | B | C | B | B | B | B | B | B | B |
| 126 | H | E | E | E | E | O | - | B | B | B | B | B | B | B |
| 127 | H | - | - | - | - | B | C | B | B | B | B | B | B | B |
| 131 | H | E | E | E | E | O | - | B | B | B | B | B | B | B |
| 133 | H | - | - | - | - | B | C | B | B | - | B | B | B | B |
| 141 | H | E | E | E | E | O | E | H | B | B | B | B | B | B |
| 154 | H | E | E | E | E | O | - | B | B | B | B | B | B | B |
| 158 | H | E | E | E | E | O | - | B | B | B | B | B | B | B |
| 159 | H | - | - | - | - | B | C | B | B | - | B | B | B | B |
| 160 | H | E | E | E | E | O | - | B | B | B | B | B | B | B |
| 161 | H | E | E | E | E | O | - | B | B | B | B | B | B | B |
| 163 | H | - | - | - | - | B | C | B | B | B | B | B | B | B |
| 167 | H | - | - | - | - | B | B | B | B | B | B | B | B | B |
| 171 | H | - | - | - | - | B | B | B | B | B | B | B | B | B |
| 175 | H | E | E | E | O | O | B | B | B | B | B | B | B | B |
| 179 | H | - | - | - | B | B | B | B | B | B | B | B | B | B |
| 193 | H | E | E | E | E | O | B | B | B | B | B | B | B | B |
| 35 | H | D | D | O | O | O | H | H | B | D | H | O | O | O |
| 135 | H | E | E | E | E | O | H | H | B | D | H | O | O | O |
| 17 | H | B | B | B | B | B | - | B | B | D | H | O | O | O |
| 20 | B | B | B | B | B | B | B | B | B | D | H | O | O | O |
| 38 | B | B | B | B | B | B | - | B | B | D | H | O | O | O |
| 93 | B | B | B | B | B | B | B | B | B | D | H | O | O | O |
| 105 | B | B | B | B | B | B | B | B | B | D | H | O | O | O |
| 145 | B | - | - | - | B | B | B | B | B | B | B | B | B | B |
| 180 | B | - | - | B | B | B | B | B | B | B | B | O | O | O |

Fréquence d'individus

recombinés*

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------------|--------|-------|-------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|
| Intervalle M1 - R | 0,97 | 0,97 | 0,97 | 0,87 | 0,61 | 0,29 | 0,13 | | | | | | | | |
| Intervalle R - M2 | | | | | | | | | | 0,67 | 0,78 | 0,89 | 0,89 | 0,89 | |
| Distance / résistance (cM) | 11,4** | 11,03 | 11,03 | 11,03 | 9,88 | 6,90 | 3,33 | 2,10 | 0,00 | 3,33 | 3,89 | 4,44 | 4,44 | 4,44 | 5,0** |

A : génotype homozygote pour l'allèle du parent sensible (IR64)

H : génotype hétérozygote

B : génotype homozygote pour l'allèle du parent résistant (Gigante)

D : génotype non homozygote pour l'allèle du parent résistant (gigante)

* : sous l'hypothèse d'absence de double recombinaison dans l'intervalle M1 - R et M2 - R

** : distance estimée à partir de la cartographie de la résistance sur 183 F2 (IR64 x Gigante) cf (figure X)

14 bandes provenant du parent résistant ont été également identifiées et seront confirmées ou non sur les recombinants générés dans la population F2 (IR64 x Gigante).

5 **Exemple 13** : Ancrage du locus de résistance au RYMV à l'aide de marqueurs microsatellites

Le marqueur M1 ayant été placé sur le chromosome 4 de la carte génétique (IR64 x Azucena ; exemple 9), des marqueurs microsatellites tel que définis dans (6) et appartenant à ce chromosome ont été utilisés pour affiner la cartographie du locus de résistance au RYMV. Les marqueurs microsatellites
10 suivants ont été testés : RM241, RM252 (1), RM273 et RM177 (6) dans les conditions expérimentales définies dans (1) et (6). A l'exception du marqueur RM177 non polymorphe entre les parents IR64 et Gigante, les marqueurs RM241, RM252, RM273 ont été cartographiés sur une population F2 (IR64 x Gigante) évaluée
15 parallèlement pour la résistance au RYMV. Les résultats sur 183 individus F2 permettent de caractériser un intervalle d'environ 3.6 cM borné par les deux locus microsatellites RM 252 et RM273 encadrant le gène de résistance au RYMV.(voir figure 10 (a))

20 **Exemple 14** : Cartographie fine de l'intervalle portant le locus de résistance et ordonnancement des marqueurs de résistance dans l'intervalle M1-M2

Les 45 individus F2 (IR64 x Gigante) résistants et recombinants pour les marqueurs M1 et M2 ont été caractérisés pour les marqueurs microsatellites identifiés dans l'exemple 13. La cartographie des marqueurs en ségrégation sur la totalité des individus F2 (IR64 x Gigante) disponibles (321) confirme l'ordre et la distance entre les
25 marqueurs de l'intervalle M1 - M2 et en particulier l'intervalle RM252 - RM273 qui est évalué à 3.6 cM (figure 10(b)). Les 45 individus F2 (IR64 x Gigante) résistants et recombinants pour les marqueurs M1 et M2 permettent de confirmer l'ordre des marqueurs AFLP identifiés dans l'exemple 12. Un marqueur AFLP EACG/MACA reste

compris dans l'intervalle RM252 - RM273 et représente le marqueur le plus proche du locus de résistance au RYMV (Tableau 9). Au total sur les 321 individus F2 testés, il reste 20 individus recombinés d'un côté ou de l'autre du locus de résistance au RYMV et qui pourront être avantageusement utilisés pour identifier des marqueurs plus proches et/ou cloner le gène de résistance.

Exemple 15 : Transfert de la résistance assistée par les marqueurs

Les marqueurs proches du locus de résistance ont été testés sur des variétés irriguées très sensibles au virus du RYMV (var. BG90-2, Bouaké189, Jaya). 3 marqueurs

(M1, RM241, RM252) présentent un polymorphisme entre ces 3 variétés et la variété Gigante ce qui permet d'envisager l'utilisation de ces marqueurs pour transférer la résistance dans des géotypes sensibles. Le transfert expérimental de la résistance dans ces variétés a été réalisé jusqu'au niveau du 2eme recroisement. A chaque croisement, les plantes sont vérifiées pour la présence des marqueurs en provenance de la variété Gigante et la ségrégation pour la résistance est contrôlée par des tests de descendance sur F2. Les résultats sont donnés dans le tableau 10.

TABLEAU 10

| parent récurrent | Polymorphisme / parent donneur (Gigante) | | | | | Génération | % théorique | Nb de lignées |
|---------------------|--|-------|-------|-------|-------|------------|------------------|---------------|
| | M1 | RM241 | RM252 | RM273 | RM177 | obtenue | parent récurrent | obtenues |
| BG90-2 | poly | poly | poly | - | - | BC2F2 | 87,5 | 4 |
| Bouaké 189 | poly | poly | poly | - | - | BC2F2 | 87,5 | 1 |
| Jaya | poly | poly | poly | - | - | BC2F2 | 87,5 | 2 |
| IR64 | poly | poly | poly | poly | mono | BC3 | 93,7 | 5 |

Exemple 16 : Utilisation du virus RYMV ou du complexe virus/ribonucléoprotéines comme appâts pour capturer les protéines cibles indispensables au cycle infectieux du RYMV.

5 I Caractérisation *in vitro* et *in vivo* de trois isoformes du RYMV calcium et pH indépendantes

Trois isoformes sont décrites en utilisant la chromatographie échangeuse d'ions, le principe de cette séparation est basé sur la stabilité des particules.

10 Les formes compactes sont les plus stables car elles sont bloquées par les ions divalents calcium rendant la particule insensible au pH. Cette forme n'accroche pas la résine échangeuse d'ions et traverse la colonne sans dommage. Les formes transitionnelles sont décrites pour la première fois et résultent de particules compactes ou de particules gonflées. Ces particules sont sans calcium, ce qui les rend sensibles au pH. Ainsi, à pH acide, elles sont gardées compactes, alors qu'à pH basique elles sont gonflées. On peut différencier ces deux
15 isoformes (compactes et transitionnelles) par modification du pH dans le tampon de chromatographie. A pH basique, les particules transitionnelles instantanément gonflent et explosent dans la colonne, car elles ne sont pas suffisamment stables pour supporter la pression du chromatographe (environ 1000 à 1500 psi) pression. La protéine de capsid, qui résulte de cette dissociation, s'accroche sur
20 la résine échangeuse d'ions. Les formes compactes sont purifiées ainsi à pH basique. Les formes gonflées sont très difficiles à isoler du fait de leur instabilité, mais peuvent être produites en présence d'un chélateur d'ions divalents (EDTA ou EGTA) et à pH basique à partir de particules compactes. Ainsi, après ce traitement, toutes les particules deviennent instables et explosent
25 dans la colonne.

Conformément à l'invention, pour capturer les protéines cibles, on utilise :

I La particule compacte obtenue après dialyse dans 10 mM acétate de sodium pH 5,0 et CaCl_2 3 mM, environ 6 heures et purification par chromatographie à pH 8,0. Protéines cibles isolées après extraction du virus des plantes infectées ou après exposition des particules compactes (purifiées par Biocad) et protéines
5 extraites de suspension cellulaire d'une variété sensible au virus (IR64).

II La particule transitionnelle est obtenue à partir de la particule compacte en présence d'EDTA et à pH acide.

III La particule gonflée et le complexe ribonucléique sont obtenus à partir des particules transitionnelles à pH basique. A ce pH, le complexe
10 ribonucléoprotéique est obtenu spontanément à partir des particules gonflées (très instables).

II /Méthode pour capturer les protéines cibles

-A partir de virus extrait de plantes sensibles (IR64) infectées.

Les résultats sont présentés en figure 12. Fig.12A: chromatogramme contrôle
15 sans injection à pH 8,5; Fig. 12B:chromatogramme après injection de 100 μl de virus à 1.7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, pH 8,5, méthode 1 (gradient NaCl de 0 à 2550 mM), Fig.12C: chromatogramme après injection de 100 μl de virus dialysé durant environ 14h dans 10 mM acétate de sodium pH 5 et 3 mM CaCl_2 ; Figure 12D: chromatogramme après injection de 100 μl de virus (non dialysé) à 1.7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$,
20 pH 8.5, méthode 2 (gradient NaCl de 0 à 1500 mM et 1500 à 2550 mM, voir méthode après les exemples). Récolte des fractions (1 ml), précipitation acétone 800 μl , 2 heures à 4 °C, centrifugation 20 minutes 13000tr/mn, culot séché au speed-vack 5 min., puis remis en suspension dans environ 40 μl de tampon Tris-base 10 mM, pH 7,4. Les échantillons sont conservés au congélateur à -20°C.

25 Après injection de 170 μg de virus dans le Biocad à pH : 8,0, méthode 1 (Figure 13A), les différentes fractions sont récoltées, précipitées à l'acétone, reprise dans un tampon Tris-base 10 mM, pH 7,4 et déposées sur mini-gel SDS-PAGE puis le gel est révélé au nitrate d'argent (Biorad) (Figure 13B) et Western-

blot (Figure 13C) en utilisant un anticorps monoclonal non discriminant MabE.5 (Denis Fargette,IRD) anti -protéine de capside.

Les bandes non immunodétectées correspondent à des protéines de plante potentiellement intéressantes. Il s'agit de protéines de 5, 24, 42, 49, 59, 66, 70, 77 et 210 kDa

-A partir de virus extrait, dialysé (durant environ 14h dans 10 mM acétate de sodium pH 5,0 et CaCl₂ 3 mM), puis purifié sur Biocad = fraction 2 (A2) , le virus est mis en contact avec les protéines de suspension cellulaire de riz (IR 64) pour piéger des protéines cibles.

Purification et vérification de la pureté de la fraction 2 (Fig. 14A). Dans la fraction 2, le virus est pur car il n'y a plus de présence de sous-bandes détectées après un gel de SDS-PAGE et révélation au nitrate d'argent (Fig. 14B et 14C, fraction A2 à comparer avec B2 dans les Fig. 13B et 13C). Après une incubation de 350 µg de virus et 860 µg de protéines extraites de suspension cellulaire (IR64) à 4°C, pendant 12 heures, dans différentes solutions d'incubation (Fig 15), les échantillons sont extraits, avec ou sans NaCl. Les échantillons sont ensuite purifiés sur Biocad et la fraction virale après précipitation à l'acétone (fraction 2 et 3); est analysée sur grand gel SDS-PAGE coloré au nitrate d'argent (Fig 15A) et immunodétection avec le Mab E.5 (Fig 15B) .

Les protéines cibles (non immunodétectées par le Mab E.5) ont des poids moléculaires similaires à celles isolées des feuilles infectées ; elles sont particulièrement visibles dans les conditions D2 (pH 8,0 avec 10 mM DTT et 0,3 M de NaCl): il s'agit des protéines de 24, 45, 51, 57, 63, 85 et des protéines situées au-dessus de 120 kDa.

III/ Clonage des protéines cibles et utilisation pour l'identification d'une nouvelle classe de gènes de résistance

Les protéines cibles isolées sont séquencées dans leur partie N-terminale (protéines 24, 42-45 kDa , protéines aux environs de 57, 63 et 85 kDa, et les protéines supérieures à 120kDa). On identifie des amorces 5' dégénérées. Le clonage des ADNc est effectué dans les banques des variétés indica (IR64 et Gigante), japonica tempéré (02428), japonica tropical (Azucena) et glaberrima (TOG 5681 et TOG 5673). On procède ensuite à l'analyse des séquences en utilisant les techniques classiques (homologie, fonction putative et polymorphisme).

IV/Matériels et Méthodes

- 10 Extraction du virus: L'extraction est réalisée à l'aide des étapes consistant à : récolter des feuilles fraîches (ou conservées à -80°C) de plantes infectées par le virus (les symptômes doivent être prononcés). La durée d'infection dépend de la variété de riz utilisée (les variétés tolérantes permettent d'obtenir une plus grande quantité de virus).
- 15 -Broyer les feuilles dans l'azote liquide pour obtenir une poudre fine, et conserver au froid.
- Ajouter le tampon d'extraction (Acétate de sodium* 0,1 M pH : 5,0) additionné de β -mercaptoéthanol à 0.2% (\approx 1 litre de tampon pour 100 g de feuilles broyées) et agiter pendant 2 mn.
- 20 -Filtrer la suspension obtenue avec un tissu de type « cheesecloth » et presser à la main le culot restant dans le tissu.
- Ajouter 1 volume de chloroforme et agiter pendant 2 mn.
- Centrifuger à 10000g pendant 10 mn à 4°C .et récupérer la phase aqueuse supérieure.
- 25 -Evaluer le volume de la phase aqueuse et ajouter du NaCl pour une concentration finale 0.3M. Laisser dissoudre (en chambre froide) et ajouter du PEG8000 pour une concentration finale de 6%.

- Laisser sous agitation pendant la nuit. (précipitation des virus)
- Centrifuger la suspension pendant 30mn à 22000 g à 4°C dans des pots de 250ml.
- Jeter le surnageant et sécher quelques minutes à l'air le culot de virus. Reprendre le culot de chaque pot par 1ml de tampon d'extraction (1) et remettre en suspension au froid.
- Réunir les fractions obtenues et rincer les pots avec 0.5ml de tampon que l'on rajoute aux fractions précédentes.
- Centrifuger 10 mn à 12000g pour éliminer les impuretés solides et récupérer le surnageant.
- Doser, après dilution, au spectrophotomètre à 259 nm et calculer la concentration du virus :

$$\frac{D.O.259 \times \text{dilution}}{6.5} \text{ en } \mu\text{g}/\mu\text{l}$$
 où 6,5 correspond à la D.O. 259 d'une suspension virale à 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.
- Un rapport $\frac{D.O.259}{D.O.280} \geq 1,5$ montre une bonne purification du virus, sinon effectuer une purification par gradient de sucre.

- * Solution A : Acide acétique 2M (115,5 dans 1000ml) et solution B : acétate de sodium 2M (164 g de $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$ ou 272 g de $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}$, $3\text{H}_2\text{O}$ dans 1000 ml.
- 14,8 ml de solution A + 35,2 ml de solution B dans 1000 ml total, ajouter d'abord la solution B, puis la solution A progressivement jusqu'à l'obtention du pH 5 ; ajuster le pH si nécessaire avec de la solution A.

- Laisser sous agitation pendant la nuit. (précipitation des virus)
- Centrifuger la suspension pendant 30mn à 22000 g à 4°C dans des pots de 250ml.
- Jeter le surnageant et sécher quelques minutes à l'air le culot de virus. Reprendre le culot de chaque pot par 1ml de tampon d'extraction (1) et remettre en suspension au froid.
- Réunir les fractions obtenues et rincer les pots avec 0.5ml de tampon que l'on rajoute aux fractions précédentes.
- Centrifuger 10 mn à 12000g pour éliminer les impuretés solides et récupérer le surnageant.
- Doser, après dilution, au spectrophotomètre à 259 nm et calculer la concentration du virus :
- $$\frac{D.O.259 \times \text{dilution}}{6.5} \text{ en } \mu\text{g}/\mu\text{l}$$
- où 6,5 correspond à la D.O. 259 d'une suspension virale à 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.
- Un rapport $\frac{D.O.259}{D.O.280} \geq 1,5$ montre une bonne purification du virus, sinon effectuer une purification par gradient de sucrose.

- * Solution A : Acide acétique 2M (115,5 dans 1000ml) et solution B : acétate de sodium 2M (164 g de $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$ ou 272 g de $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}$, $3\text{H}_2\text{O}$ dans 1000 ml.
- 14,8 ml de solution A + 35,2 ml de solution B dans 1000 ml total, ajouter d'abord la solution B, puis la solution A progressivement jusqu'à l'obtention du pH 5 ; ajuster le pH si nécessaire avec de la solution A.

Six semaines plus tard, les cals développés à partir des embryons sont mis en cultures dans du milieu liquide utilisé pour la multiplication cellulaire (plusieurs formations globuleuses provenant de plusieurs cals, par Erlen).

Trois semaines plus tard, les cals mis en culture en milieu liquide ont proliféré, et
 5 les suspensions sont repiquées. Ensuite les suspensions sont repiquées tous les 10-15 jours et les protéines extraites.

MILIEUX DE CULTURE POUR SUSPENSIONS CELLULAIRES DE RIZ

Milieu SZ (Zhang *and al.* 1998).

10

MACRO ELEMENTS X 10 (pour 1 litre)

100 ml de solution mère par litre de solution finale

| | | |
|----|---|---|
| | KNO ₃ | 40,00 g |
| | (NH ₄) ₂ SO ₄ | 3,30 g |
| 15 | MgSO ₄ , 7H ₂ O | 2,46 g |
| | NaH ₂ PO ₄ | 2,76 g (2H ₂ O : 3,12g - anhydre : 2,40 g) |
| | CaCl ₂ , 2H ₂ O | 1,47 g |

B5 MICRO ELEMENTS X 100 (pour 1 litre)

20 *10 ml de solution mère par litre de solution finale*

| | | |
|----|--|-------------------------------------|
| | MnSO ₄ , 7H ₂ O | 1349 mg |
| | ZnSO ₄ | 112 mg (7H ₂ O : 200 mg) |
| | KI | 75 mg |
| | Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O | 25 mg |
| 25 | H ₃ BO ₃ | 300 mg |
| | CuSO ₄ , 5H ₂ O | 2,5 mg |
| | CoCl ₂ , 6H ₂ O | 2,5 mg |

B5 VITAMINES X 1000 (pour 100 millilitres)*1 ml de solution mère par litre de solution finale*

| | | |
|---|-------------------|---------|
| | Acide nicotinique | 100 mg |
| | Thiamine-HCl | 1000 mg |
| 5 | Pyridoxine-HCl | 100 mg |
| | Myo-Inositol | 10 g |

| | | |
|----|------------------------------------|--------------------|
| | Proline | 500 mg/litre final |
| | Glutamine | 500 mg/litre final |
| 10 | Hydrolysate enzymatique de caséine | 300 mg/litre final |

Fer EDTA X1000 (pour 1 litre)*1 ml de solution mère par litre de solution finale*

| | | |
|----|---|-------|
| | Sinon FeSO ₄ , 7H ₂ O | 2,8 g |
| 15 | Na ₂ EDTA | 3,7 g |

HORMONE 2,4-D X 1000*1 ml de solution mère par litre de solution finale*

Solution stock à 2 mg/ml

20

MALTOSE ET SUCROSE (POUR 2428) à 30g/lpH 5.8

MILIEUX D'INDUCTION DE LA CALLOGENESE DU RIZ

25 M.S. (Murashige T. & Skoog F. 1962)MACRO ELEMENTS X 10 (pour 1 litre)

100 ml de solution mère par litre de solution finale

| | | |
|---|---------------------------------------|---------|
| | KNO ₃ | 19,00 g |
| | NH ₄ NO ₃ | 16,50 g |
| | MgSO ₄ , 7H ₂ O | 3,70 g |
| 5 | KH ₂ PO ₄ | 1,70 g |
| | CaCl ₂ , 2H ₂ O | 4,40 g |

MICRO ELEMENTS X 100 (pour 1 litre)*10 ml de solution mère par litre de solution finale*

| | | |
|----|--|---------|
| 10 | MnSO ₄ , H ₂ O | 1690 mg |
| | ZnSO ₄ , 7H ₂ O | 860 mg |
| | KI | 83 mg |
| | Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O | 25 mg |
| | H ₃ BO ₃ | 620 mg |
| 15 | CuSO ₄ , 5H ₂ O | 2,5 mg |
| | CoCl ₂ , 6H ₂ O | 2,5 mg |

VITAMINES X 1000 (pour 100 millilitres)*1 ml de solution mère par litre de solution finale*

| | | |
|----|-------------------|--------|
| 20 | Acide nicotinique | 50 mg |
| | Thiamine-HCl | 10 mg |
| | Pyridoxine-HCl | 50 mg |
| | Myo-Inositol | 10 g |
| | Glycine | 200 mg |

25 Fer EDTA X1000 (pour 1 litre)*1 ml de solution mère par litre de solution finale*

Sinon $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ 2,8 g

Na_2EDTA 3,7 g

HORMONE 2,4-D X 1000

5 *1 ml de solution mère par litre de solution finale*

Solution stock à 2 mg/ml

MALTOSE OU SUCROSE à 30g/l

10 pH 5,8

PHYTAGEL 2.5 g/litre

NB (Milieu d'induction et de subculture de cals)

15 N6 MACRO ELEMENTS X 10 (pour 1 litre)

100 ml de solution mère par litre de solution finale

KNO_3 28,30 g

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4,63 g

$\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ 1,40 g

20 KH_2PO_4 4,00 g

$\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ 1,65 g

B5 MICRO ELEMENTS X 100 (pour 1 litre)

10 ml de solution mère par litre de solution finale

25 $\text{MnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ 1349 mg

ZnSO_4 112 mg (7 H_2O : 200 mg)

KI 75 mg

$\text{Na}_2\text{MoO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$ 25 mg

| | |
|-----------------|--------|
| H_3BO_3 | 300 mg |
| $CuSO_4, 5H_2O$ | 2,5 mg |
| $CoCl_2, 6H_2O$ | 2,5 mg |

5 B5 VITAMINES X 1000 (pour 100 millilitres)

1 ml de solution mère par litre de solution finale

| | |
|--------------------|---------|
| Acide nicotinique | 100 mg |
| Thiamine-HCl | 1000 mg |
| Pyridoxine-HCl | 100 mg |
| 10 Myo-Inositol | 10 g |

Ou vitamines de Gamborg à 11,2

Ajouter : concentration finale

| | |
|------------------------------------|--------------------|
| Proline | 500 mg/litre final |
| 15 Glutamine | 500 mg/litre final |
| Hydrolysate enzymatique de caséine | 300 mg/litre final |

Fer EDTA X1000 (pour 1 litre)

1 ml de solution mère par litre de solution finale

| | |
|-----------------------------|-------|
| 20 Sinon $FeSO_4, 7H_2O$ | 2,8 g |
| Na_2EDTA | 3,7 g |

Ou EDTA Sel de sodium ferrique (Sigma E-6760) à 4,15 g/l

25 HORMONE 2,4-D X 1000

1 ml de solution mère par litre de solution finale

Solution stock à 2 mg/ml

MALTOSE ET SUCROSE à 30g/l

PHYTAGEL 2,6 g/litre

5 pH 5.8

EXTRACTION DES PROTEINES

EXTRACTION DES PROTEINES DES SUSPENSIONS CELLULAIRES

- Tampon d'extraction pour suspensions cellulaires:

| | concentration finale | pour 100 ml |
|---|-------------------------|----------------------------------|
| Tris | 20 mM, pH 7.4 | 50 ml de Tris 40 mM pH7.4 |
| NaCl | 100 mM | 584 mg |
| Na ₂ EDTA, 2H ₂ O | 10 mM | 372 mg |
| Glucose | 25 mM | 856 mg |
| SDS (dénaturant) | 0.1% | 0.5 ml de SDS 20% |
| Triton-X-100 (non-dénaturant) | 0.1% | 100 µl |
| DNases et RNases | 1µg/ml | |
| Inhibiteurs de protéines | | 2 pastilles ou 4 ml de sol conc. |
| EGTA | 5 mM | 190 mg |
| Glycérol | 5% | 5 ml |
| DTT | 5 mM | 77 mg |

Réajuster le pH à 7.4 avec HCl

- 10
- 5 g de suspensions cellulaires sont mises dans un mortier avec du sable de Fontainebleau stérilisé.
 - Ajout de 1 ml de tampon et broyage, puis ajout de 4 ml de tampon.
 - Les variétés de riz sont extraites ainsi en conditions dénaturantes (tampon avec SDS) et en conditions non-dénaturantes (tampon avec Triton).
- 15
- Centrifugation 15 mn à 15000g à 3°C.

| Stacking gel à 5% | Pour 1 gel de 1mm |
|-------------------------------|----------------------|
| Acrylamide bis-acrylamide 40% | 250 µl |
| Tris-HCl 1M pH 6.8 | 250 µl |
| SDS 20% | 10 µl |
| Persulfate d'ammonium 10% | 20 µl |
| Temed | 2 µl |
| H ₂ O | 1.5 ml |

- Le running gel est coulé jusqu'à 2 cm du haut de la plaque puis recouvert de butanol-1 (facilite la polymérisation en évitant le contact de l'air).
- 5 • Après polymérisation(15-30mn), retirer le butanol avec un papier Whatmann, puis couler le stacking gel et mettre en place le peigne.
- Après polymérisation, laver les puits avec le **tampon de migration**, puis charger les échantillons auparavant dénaturés 5 mn à 98°C avec 1 volume de **tampon de charge**.
- 10 • Faire migrer à 80V jusqu'à ce que le bleu rentre dans le running gel, puis augmenter jusqu'à 100V; arrêter la migration quand le bleu est sorti du gel (env. 5 kDa).
- Transférer les gels sur une membrane nitrocellulose 0.45µ (BIO-RAD ref: 1620115) pendant 1 h à 100V dans le **tampon de transfert**.
- 15 • Conserver les membranes humides au réfrigérateur, jusqu'à utilisation.

**MODE OPERATOIRE POUR L'UTILISATION DE L'ANTICORPS
POLYCLONAL MALI (Pab Mali).**

- Toutes les étapes d'incubation/lavage se font sur un agitateur à plateau de type Platform Shaker SRP6 (Stuart Sciences) à la vitesse de 20/25 REV/mn à température ambiante à $\cong 23^{\circ}\text{C}$.
- Les volumes de solution utilisés pour les étapes d'incubation/lavages sont de 20 ml et effectuées dans des boîtes de plastique de 112mm x 77 mm.
- La membrane est incubée pendant 1h avec la solution de blocage
- Incubation 1h avec le 1^{er} anticorps **Polyclonal Mali** (anti RYMV) dilué au 1/1000^{ème} dans la même solution de blocage (récupérer la solution, ajouter l'anticorps, agiter et remettre sur la membrane).
- Rinçages 6 x 5 mn dans le TBS pH 7.5
- Incubation 1h avec le 2^{ème} anticorps conjugué HRP- anti-lapin dilué au 1/40000^{ème} dans la solution de blocage neuve.
- Rinçages 6 x 5 mn dans le TBS pH 7.5.
- Mettre la membrane sur un film Saran, et verser de façon uniforme (la membrane doit être bien recouverte) la solution West Pico préparée en mélangeant à parts égales les 2 solutions (3 ml total par petite membrane).
- Attendre 5 mn (à la lumière), éliminer le substrat en excès, envelopper la membrane dans le Saran, puis mettre un film dessus (dans le noir) et exposer de 1 mn à 1 heure.
- Pour les hybridations aux pH 6,5 et pH 8,0, opérer de la même façon en utilisant un tampon MES à pH 6.5 et un tampon TAPS à pH 8.0 pour toutes les étapes d'hybridation et de lavage.

MODE OPERATOIRE POUR L'UTILISATION DE L'ANTICORPS
MONOCLONAL E (Mab E).

- Toutes les étapes d'incubation/lavage se font sur un agitateur à plateau de type Platform Shaker SRP6 (Stuart Sciences) à la vitesse de 20/25 REV/mn à température ambiante à $\approx 23^{\circ}\text{C}$.
- Les volumes de solution utilisés pour les étapes d'incubation/lavages sont de 20 ml et effectuées dans des boîtes de plastique de 112mm x 77 mm.
- La membrane est incubée pendant 1h avec la solution de blocage
- Incubation 1h avec le 1^{er} anticorps Monoclonal E (épitope anti RYMV) dilué au 1/100^{ème} ou au 1/1000^{ème} dans la même solution de blocage (récupérer la solution, ajouter l'anticorps, agiter et remettre sur la membrane).
- Rinçages 6 x 5 mn dans le TBS pH 7.5
- Incubation 1h avec le 2^{ème} anticorps conjugué HRP- anti-souris dilué au 1/40000^{ème} dans la solution de blocage neuve.
- Rinçages 6 x 5 mn dans le TBS pH 7.5.
- Mettre la membrane sur un film Saran, et versé de façon uniforme (la membrane doit être bien recouverte) la solution West Pico préparée en mélangeant à parts égales les 2 solutions (3 ml total par petite membrane).
- Attendre 5 mn (à la lumière), éliminer le substrat en excès, envelopper la membrane dans le Saran, puis mettre un film dessus (dans le noir) et exposer de 1 mn à 1 heure.
- Pour les hybridations aux pH 6,5 et pH 8,0, opérer de la même façon en utilisant un tampon MES à pH 6,5 et un tampon TAPS à pH 8,0 pour toutes les étapes d'hybridation et de lavage.

SOLUTIONS:

- Tampon de charge 2X:

| Concentration de la solution 2X | Quantité de produit pour 10 ml de sol. 2X |
|---------------------------------|---|
| 100 mM Tris-HCl pH 6.8 | 1 ml de Tris-HCl 1M pH 6.8 |
| 200 mM DTT | 0.308 g |
| 4 % SDS | 2 ml SDS à 20 % |
| 0.2 % Bleu de bromophénol | 20 mg |
| 20% glycérol | 2 ml |
| | H ₂ O q.s.p. 10 ml |

• **Tampon de migration 10X :**

| Concentration de la solution 10X | Quantité de produit pour 1l de sol. 10X |
|----------------------------------|---|
|----------------------------------|---|

| | |
|------------------|-----------------------|
| 250 mM Tris base | 30,285 g de Tris base |
| 2,5 M glycine | 187,67 g de glycine |

• **Tampon de transfert:**

| | |
|------------------|-----------------|
| Tris base | 2.42 g |
| Glycine | 11.26 g |
| Méthanol | 100 ml |
| H ₂ O | q.s.p. 1 litre. |

- **Solution de blocage Polyclonaux:** 3 % de Non-Fat Dry Milk BIO-RAD (ref: 170-6404) dans le tampon approprié.

- **Solution de blocage Monoclonaux:** 0.5% de B.S.A. dans le tampon approprié.

- **TBS pH 7.5:** 2.423g Tris-base (20mM)+ 3,146g NaCl (75mM) + 0.508g MgCl₂·6H₂O (2, mM) + 0.5ml de NP-40 (0.05% Tergitol à chauffer avant utilisation car non liquide à température ambiante) + H₂O q.s.p. 1000ml. Ajuster à pH 7,5 avec HCl.

- **MES pH 6.5:** 3.904g MES (20 mM) + 4,937g KCl (75 mM) + 0,508g MgCl₂·6H₂O (2,5 mM) + 0.5ml de NP-40 (0.05% Tergitol à chauffer

avant utilisation car non liquide à température ambiante) + H₂O q.s.p.
1000ml. Ajuster à pH 6,5 avec NaOH ou HCl.

- **TAPS pH 8.0:** 4,866g TAPS (20 mM) + 4,937g KCl (75 mM) + 0,508g MgCl₂·6H₂O (2,5 mM) + 0,5ml de NP-40 (0,05% Tergitol à *chauffer avant utilisation car non liquide à température ambiante*) + H₂O q.s.p.
1000ml. Ajuster à pH 8,0 avec NaOH ou HCl.
- **Polyclonal Mali (Pab Mali):** solution d'anticorps polyclonal obtenue à partir de la particule virale entière. A diluer au 1/1000^{ème}.
- **Monoclonal E (Mab E):** solution d'anticorps monoclonal obtenue à partir d'un épitope du RYMV . A diluer au 1/50^{ème} ou au 1/1000^{ème}.
- **Conjugué HRP anti-lapin:** "ImmunoPure® Goat Anti-Rabbit IgG, (H+L), Peroxydase Conjugated" (ref PIERCE: 31460) à 0,8 mg/ml après restauration dans H₂O. Diluer au 1/40000^{ème}.
- **Conjugué HRP anti-souris:** "ImmunoPure® Goat Anti-Mouse IgG, (H+L), Peroxydase Conjugated" (ref PIERCE: 31430) à 0,8 mg/ml après restauration dans H₂O. Diluer au 1/40000^{ème}.
- **West Pico:** "SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate" (ref PIERCE: 34080). Mélanger à parts égales la Lumino/Enhancer Solution et la Stable Peroxydase Solution (3ml total pour une petite membrane 8cm x 5cm). La solution ainsi préparée se conserve 24 heures et s'utilise à la lumière.

Références bibliographiques

- 5 (1) Chen, X. et al., (1997), Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L) *Theor Appl Genet* 95 : 553-567.
- 10 (2) Panaud, O. et al., (1996), Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L) *Mol Gen Genet* 252 : 597-607.
- (3) Wu K.S. et al., (1993), Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. *Mol Gen Genet* 241 : 225-235.
- 15 (4) Zabeau et al., (1993), Selective restriction fragment amplification : a general method for DNA fingerprinting. EP 92402629.7.
- (5) Vos et al., (1995), AFLP, a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414.
- 20 (6) Temnyck *et al.* (2000), *Theor Appl Genet* 100:697-712.

REVENDICATIONS

1. Méthode d'isolement de protéines impliquées dans la reconnaissance et le transport ciblé d'un virus pathogène circulant via les plasmodermes dans une plante, caractérisée en ce qu'on soumet des échantillons renfermant des complexes desdites protéines avec des particules virales à une électrophorèse et un Western Blot en utilisant un anticorps monoclonal anti-protéine de capsid, et on récupère les bandes non immunodétectées.

2. Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que le complexe est obtenu à partir de virus extrait de plantes sensibles infectées.

3. Méthode selon la revendication 2, caractérisée en ce que le virus est le virus de RYMV et qu'on récupère des protéines de 5, 24, 42, 49, 59, 66, 70, 77 et 210 kDa.

4. Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que le complexe est obtenu à partir de virus purifié et mis en contact avec les protéines d'une suspension cellulaire de plante sensible.

5. Méthode selon la revendication 4, caractérisée en ce que le virus est le virus de RYMV et qu'on récupère des protéines de 24, 45, 51, 57, 63, 85 et au-delà de 120 kDa.

6. Les protéines telles qu'obtenues par la méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 5.

7. Application des protéines selon la revendication 6 pour le clonage des gènes de résistance à des virus pathogènes circulant via les plasmodermes dans une plante.

8. ADNc correspondant à une protéine selon la revendication 6, capable de s'hybrider avec un clone BAC criblé à partir d'une banque constituée de fragments d'ADN de 100 à 150 kb d'une variété de riz telle que IR64, par

exemple de banque BAC (Bacterial Artificial Chromosomes), ce clone BAC appartenant à un contig, ou ensemble de clones BAC chevauchant, la région comprise entre les marqueurs microsatellites RM252-RM273, de clones BAC renfermant les séquences d'ADN des marqueurs identifiés à partir de riz grâce à
5 un procédé comprenant

- l'amplification sélective de fragments d'ADN de riz d'une part d'individus résistants, d'autre part d'individus sensibles, descendant de variétés parentales, ces fragments ayant été préalablement soumis à une étape de digestion, puis de ligation pour fixer des adaptateurs complémentaires d'amorces ayant, à leur
10 extrémité, un ou plusieurs nucléotides spécifiques, l'une des amorces du couple étant marquée aux fins de révélation,

- la séparation des produits d'amplification, par électrophorèse sur gel dans des conditions dénaturantes, et

- la comparaison des profils d'électrophorèse obtenus avec des mélanges
15 de fragments issus de descendants résistants et des mélanges issus de descendants sensibles, avec les fragments provenant des variétés parentales, aux fins d'identification de bandes dont le polymorphisme est génétiquement lié au locus de résistance, cette identification étant suivie le cas échéant, à titre de validation, d'une vérification sur chacun des individus et du calcul du taux de recombinaison
20 génétique entre le marqueur et le locus de résistance.

9. ADNc selon la revendication 8, caractérisé en ce que lesdites bandes AFLP polymorphes sont spécifiquement mises en évidence dans une variété sensible au RYMV, et dans la fraction de plantes sensibles issues du croisement de cette variété avec la variété résistante Gigante.

10. ADNc selon la revendication 8 ou 9, caractérisé en ce que lesdites séquences d'ADN correspondant auxdites bandes polymorphes, portent le locus de résistance à RYMV et définissent un segment inférieur à 10cM.

5 11. ADNc selon la revendication 10, caractérisé en ce que lesdites séquences d'ADN sont des fragments EcoRI-MseI.

12. ADNc selon la revendication 11, caractérisé en ce que lesdits fragments ont une taille respectivement, de 510 pb et de 140 pb en gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes.

10 13. ADNc selon l'une quelconque des revendications 8 à 12, caractérisé en ce que lesdits fragments d'ADN correspondent à des séquences d'ADN flanquant le locus de résistance et situés de part et d'autre de ce dernier, à 5-10 cM.

14. ADNc selon la revendication 13, caractérisé en ce qu'on utilise une séquence d'ADN répondant à SEQ ID N° 3 ou SEQ ID N°9.

Figure 1

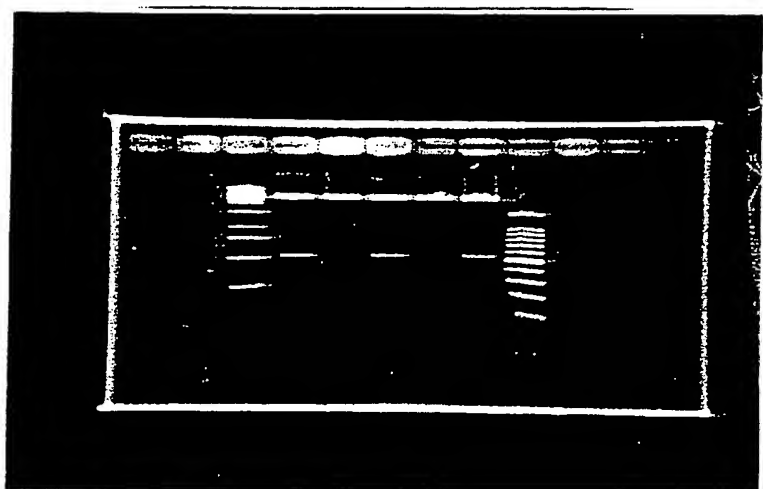
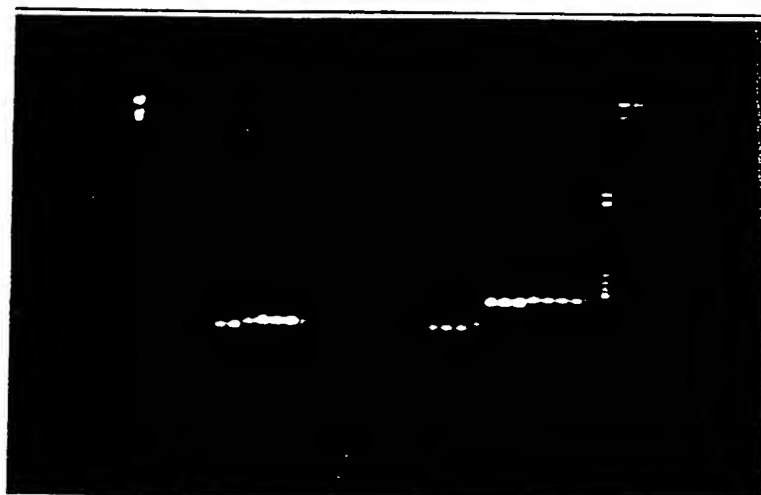


Figure 2



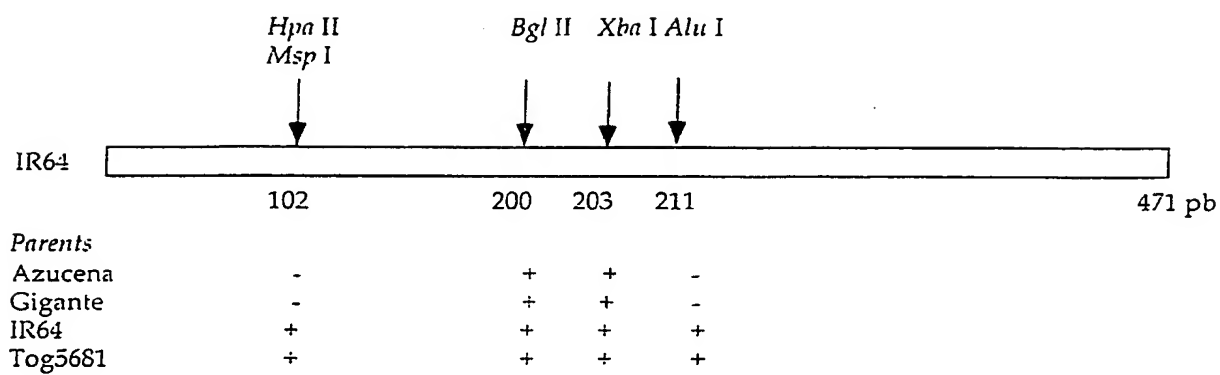
**Figure 3**

Figure 4

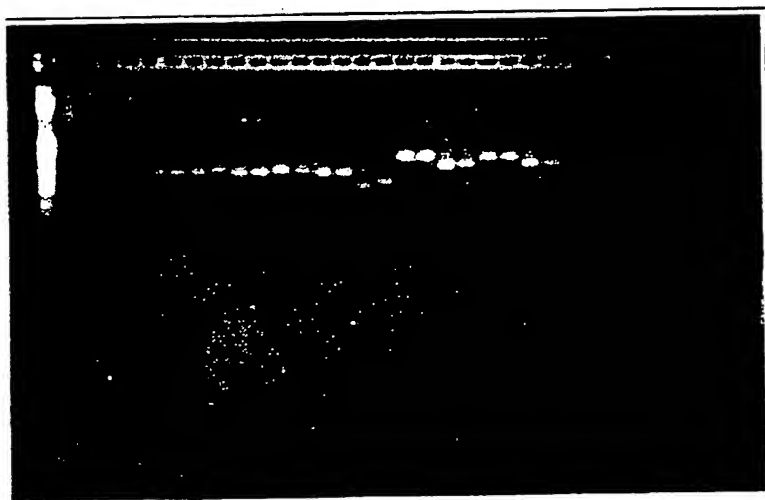


Figure 5

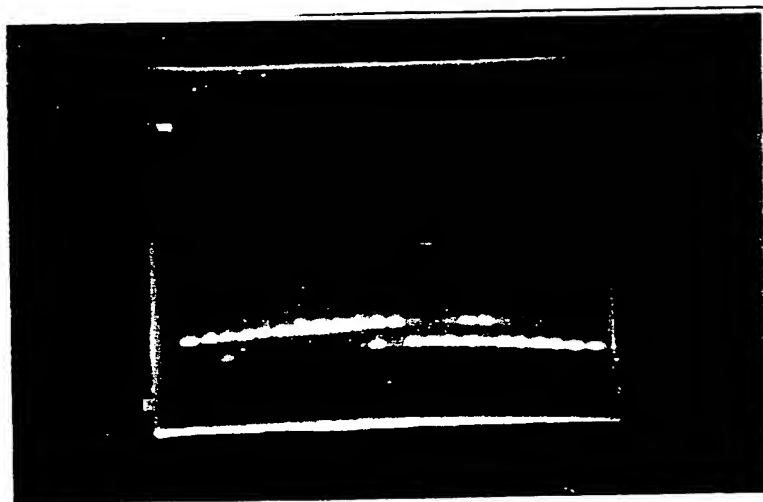
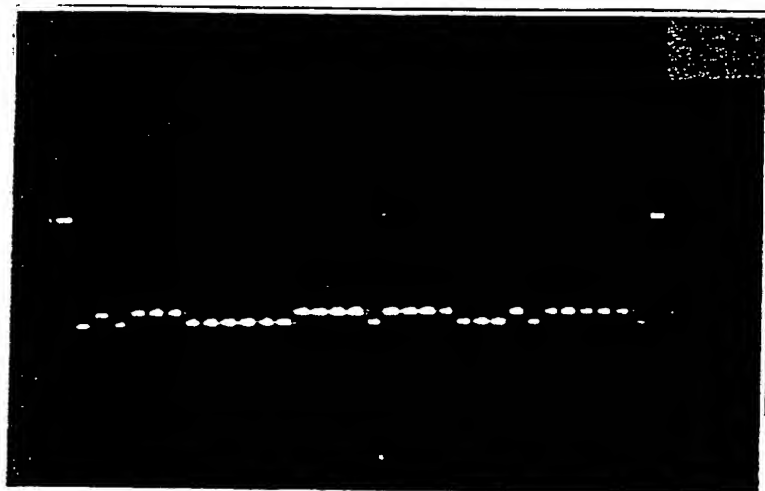
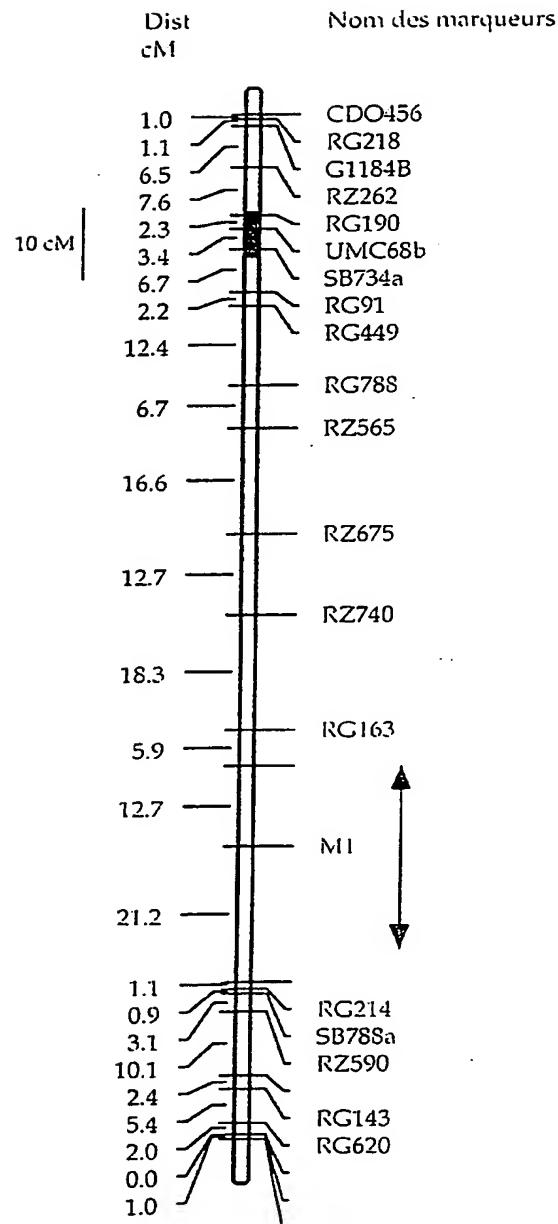


Figure 6



**Figure 7**

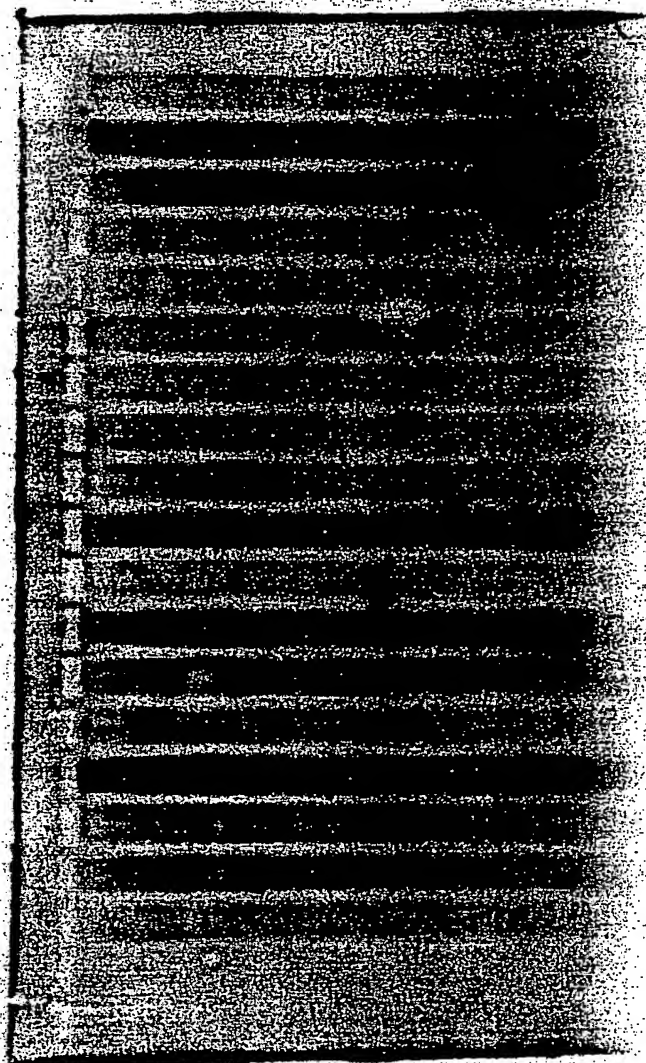
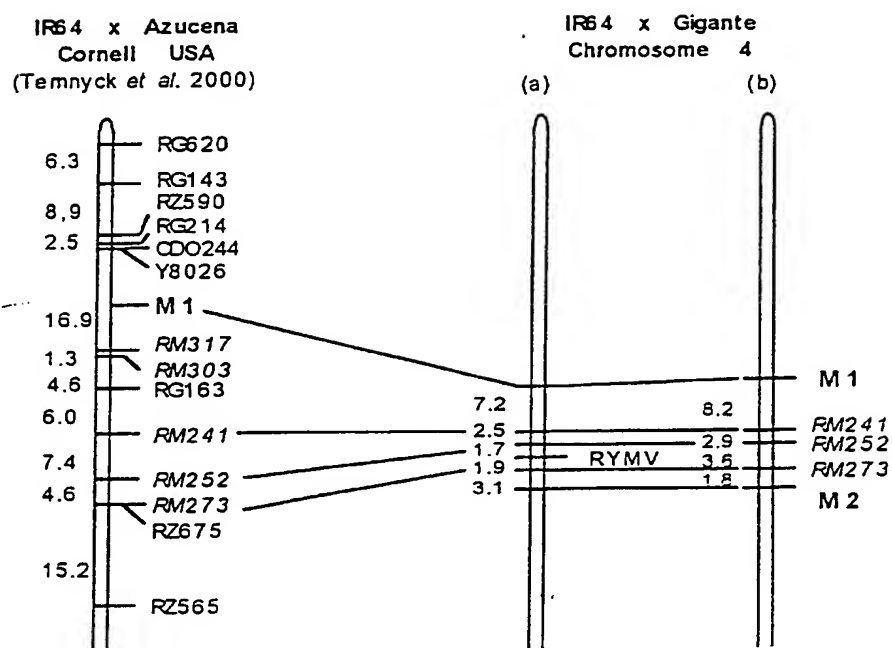


Figure 9

8/14

Figure 10

(a) : 183 F2 IR64 x Gigante (b) : 328 F2 IR64 x Gigante

9/14

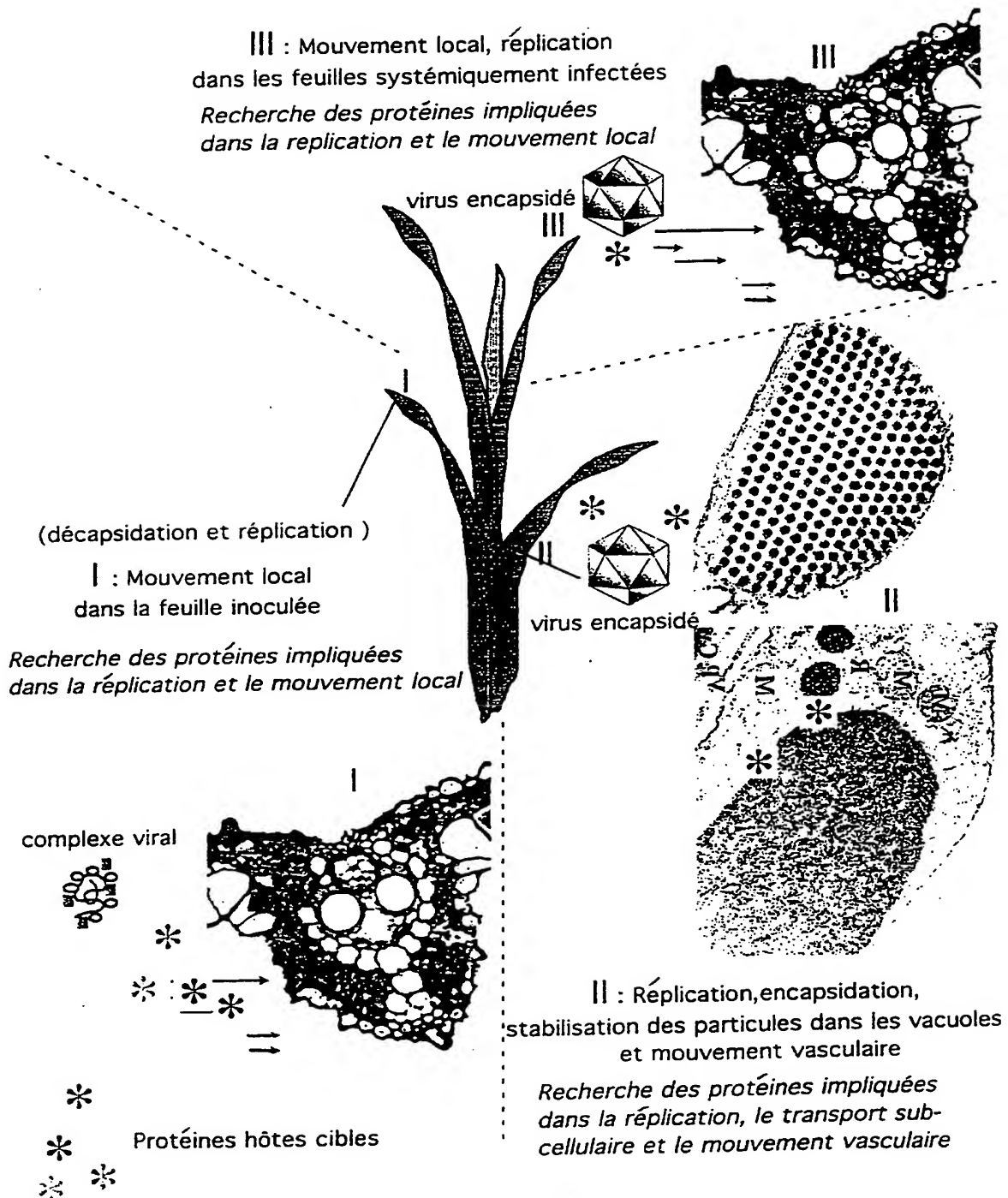


FIGURE 11

10/14
Figure 12

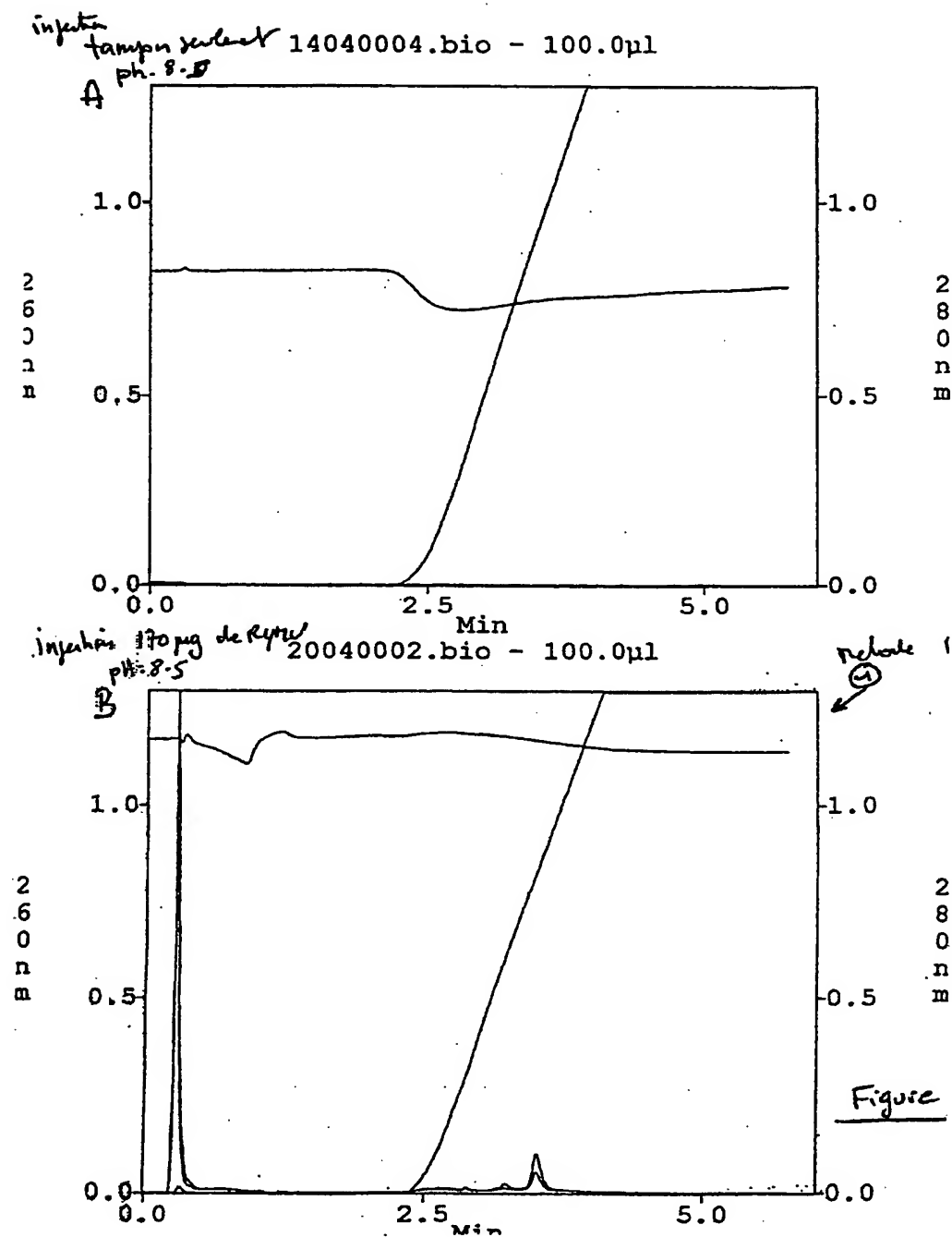
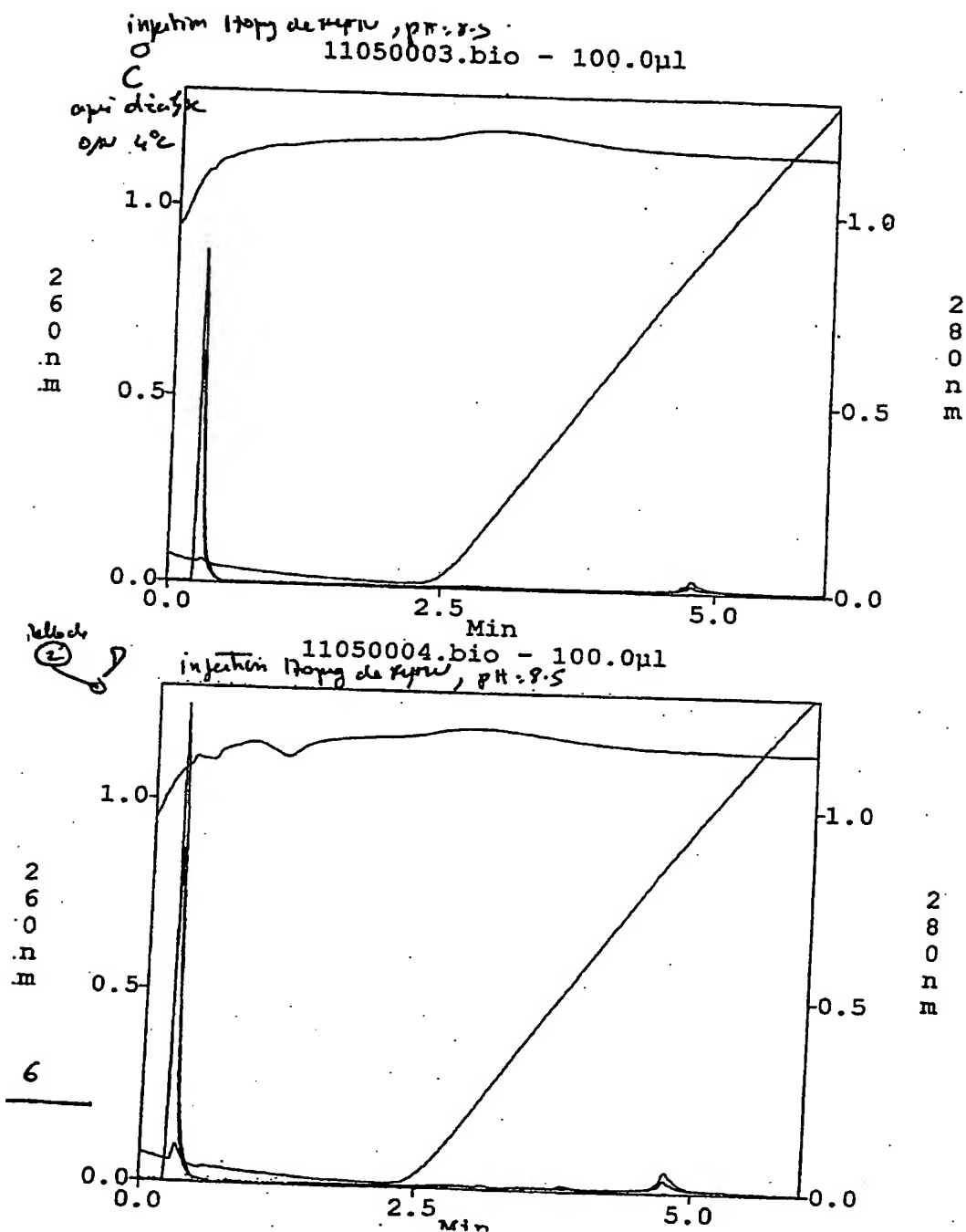


Figure 12 suite



12/14

Figure 13A

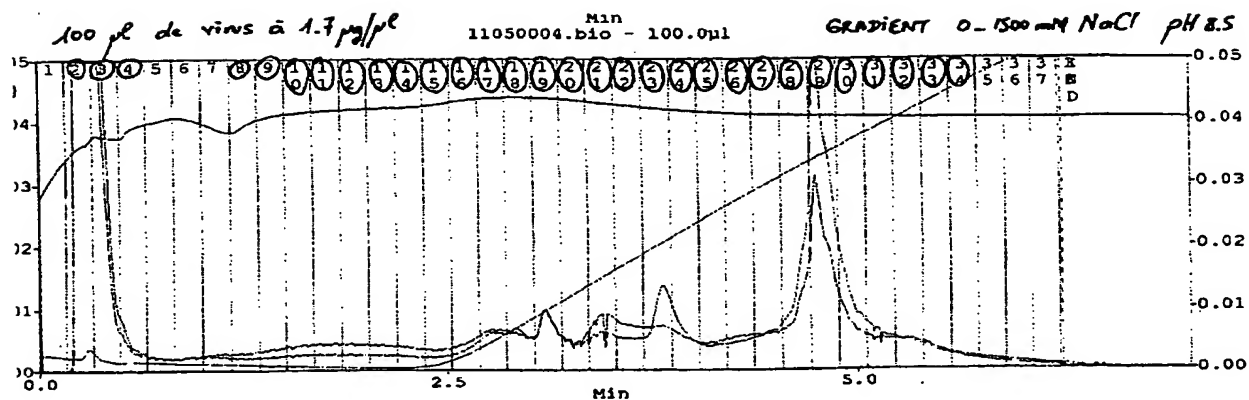
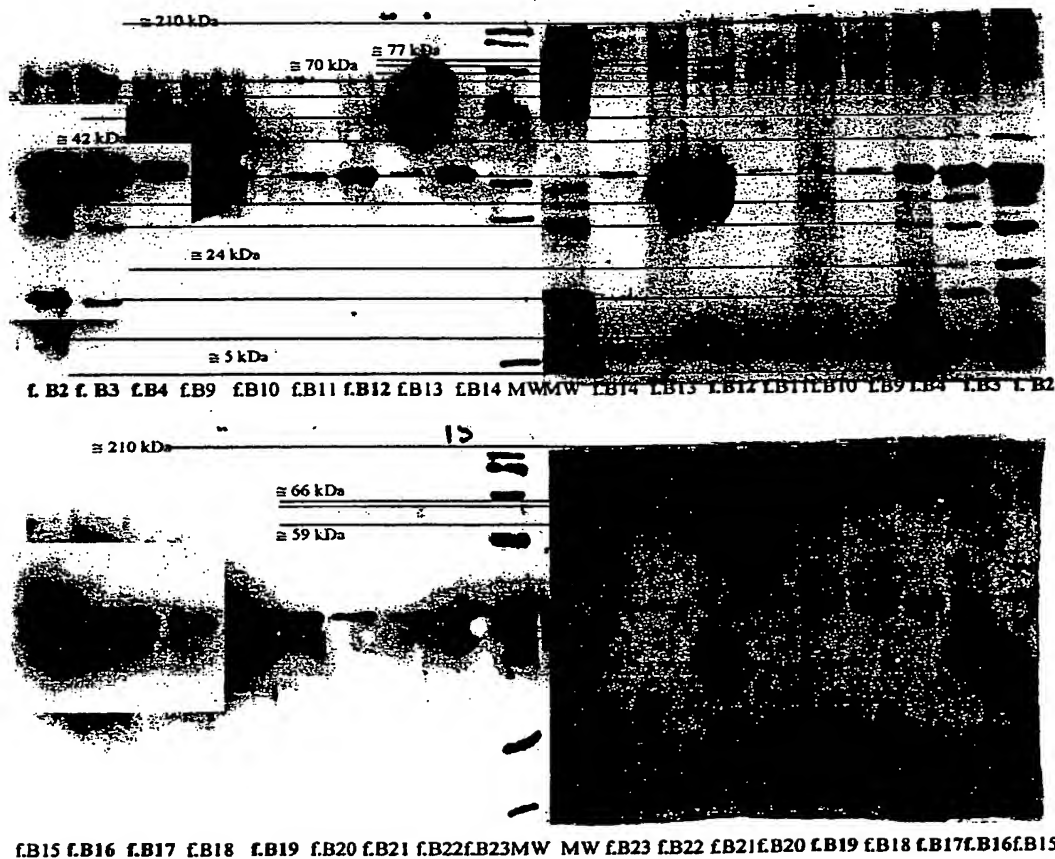


Figure 13C

Figure 13B



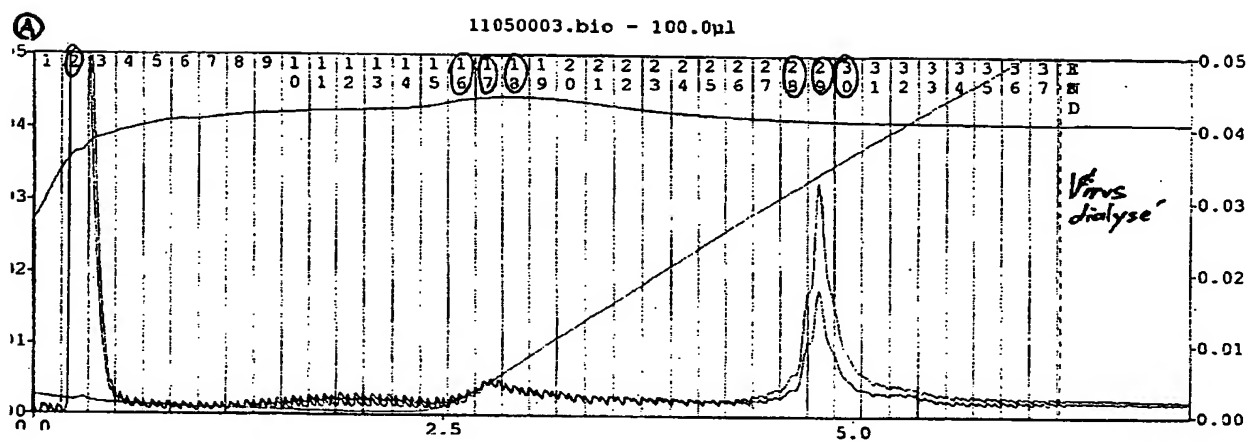


Figure 14B

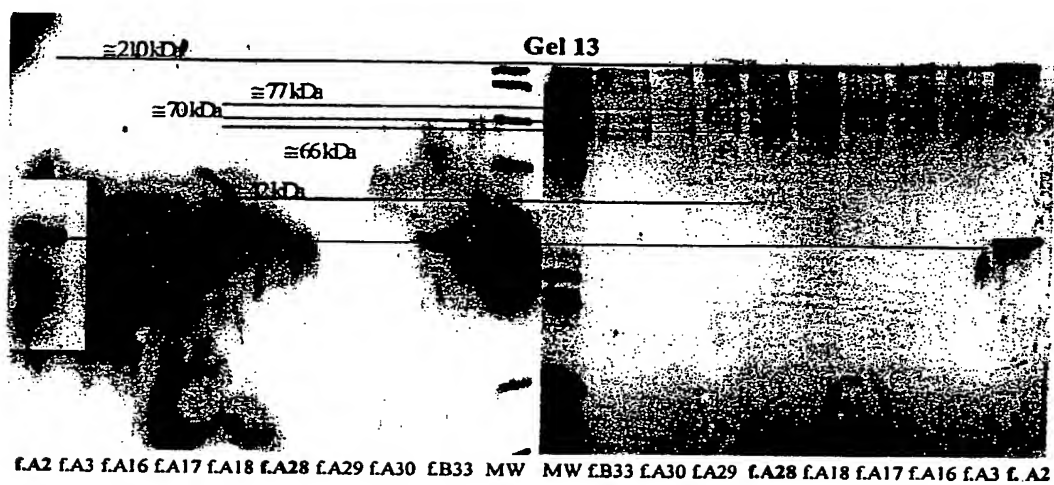
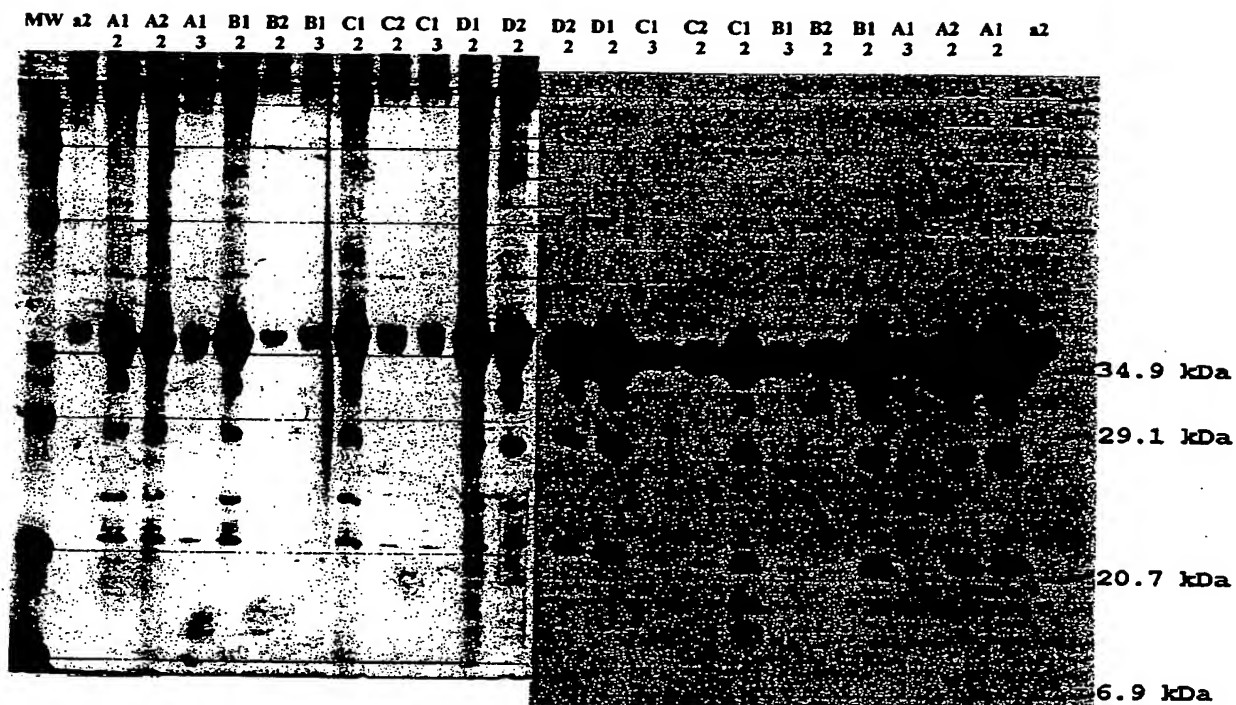


Figure 15A

Figure 15B



LISTE DE SEQUENCES

<110> I.R.D.

<120> Moyens pour l'identification d'une nouvelle classe de gènes de résistance au virus de la panachure jaune du riz et du locus d'un gène majeur de la résistance au virus, et leurs applications.

<130> 59782-1158

<140>

<141>

<150> 9907831

<151> 1999-06-21

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 16

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:Nucléotide

<400> 1

gactgcgtac caattc

16

<210> 2

<211> 16

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:Nucléotide

<400> 2

gatgagtcct gagtaa

16

<210> 3

<211> 472

<212> ADN

LISTE DE SEQUENCES

<110> I.R.D.

<120> Moyens pour l'identification d'une nouvelle classe de gènes de résistance au virus de la panachure jaune du riz et du locus d'un gène majeur de la résistance au virus, et leurs applications.

<130> 59782-1158

<140>

<141>

<150> 9907831

<151> 1999-06-21

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 16

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:Nucléotide

<400> 1

gactgcgtac caattc

16

<210> 2

<211> 16

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:Nucléotide

<400> 2

gatgagtcct gagtaa

16

<210> 3

<211> 472

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:Nucléotide

<400> 3

```
cgtgcttgct tatagcacta caggagaagg aaggggaaca caacagccat ggcgagcgaa 60
ggttcaacgt cggagaaaca ggctgcgacg ggcagcaagg tgccggcggc ggatcggagg 120
aaggaaaagg aggaaatcga agttatgctg gaggggcttg acctaagggc agatgaggag 180
gaggatgtgg aattggagga agatctagag gagcttgagg cagatgcaag atggctagcc 240
ctagccacag ttcatacgaa gcgatcgttt agtcaagggg ctttctttgg gagtatgcgc 300
tcagcatgga actgcgcgaa agaagtagat ttcagagcaa tgaaagacaa tctgttctcg 360
atccaattca attgtttggg ggattgggaa cgagttatga atgaaggtcc atggaccttt 420
cgaggatgtt cggtgctcct cgcagaatat gatggctggt ccaagattga at          472
```

<210> 4

<211> 21

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:Nucléotide

<400> 4

```
aggaagggga acacaacagc c                                     21
```

<210> 5

<211> 21

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:Nucléotide

<400> 5

```
ttatgctgga ggggcttgac c                                     21
```

<210> 6

<211> 21

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:Nucléotide

<400> 6

gcagttccat gctgagcgca t

21

<210> 7

<211> 21

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:Nucléotide

<400> 7

ccgaacatcc tcgaaaggtc c

21

<210> 8

<211> 21

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:Nucléotide

<400> 8

tcatattctg cgaggagcac c

21

<210> 9

<211> 121

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:Nucléotide

<400> 9

aattcacccc atgccctaag ttaggaagtt cttagcttag tgggtgtggtta gctttttcta 60
ttttcctaag caccattga agtattttgc attggagggtg gccttaggtt tgcctctgtt 120
a 121

<210> 10

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:Nucléotide

<400> 10

aacctaaggc cacctccaat

20

<210> 11

<211> 19

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:Nucléotide

<400> 11

gcaaacctaa ggccacctc

19

<210> 12

<211> 19

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:Nucléotide

<400> 12

attcacccca tgcctaag

19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 00/01723

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|--|-----------------------|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | OPALKA NATACHA ET AL: "Movement of rice yellow mottle virus between xylem cells through pit membranes." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 95, no. 6, 17 March 1998 (1998-03-17), pages 3323-3328, XP002149718 March 17, 1998 ISSN: 0027-8424 the whole document | 1-14 |
| A | ALBAR, L. (1) ET AL: "Genetic basis and mapping of the resistance to rice yellow mottle virus: I. QTLs identification and relationship between resistance and plant morphology." THEORETICAL AND APPLIED GENETICS, (NOV., 1998) VOL. 97, NO. 7, PP. 1145-1154., XP000892947 the whole document | 1-14 |
| A | PRESSOIR, G. ET AL: "Genetic basis and mapping of the resistance to rice yellow mottle virus: II. Evidence of a complementary epistasis between two QTLs." THEORETICAL AND APPLIED GENETICS, (NOV., 1998) VOL. 97, NO. 7, PP. 1155-1161., XP000892950 the whole document | 1-14 |
| A | WO 98 30721 A (PIONEER HI BRED INT ;BIRO RONALD L (US); FEAZEL RHONDA (US); HELEN) 16 July 1998 (1998-07-16) the whole document | 1-14 |
| P,X | DATABASE EMBL 'Online! embl; Database entry/Accession number AZ132900, 10 June 2000 (2000-06-10) WING ET AL : "A BAC sequencing framework to sequence the rice genome" XP002149653 97,5 % identity to Seq.ID.no. 9 in a 121 nt overlap abstract | 8-14 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/FR 00/01723

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| US 5898097 A | 27-04-1999 | NONE | |
| WO 9830721 A | 16-07-1998 | AU 6024598 A | 03-08-1998 |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande nationale No
PCT/FR 00/01723

| | | |
|--|---|---|
| A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 C12Q1/68 C07K14/415 | | |
| Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB | | |
| B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 C12Q C07K | | |
| Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche | | |
| Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS, CHEM ABS Data, STRAND, EMBL | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | |
| Catégorie * | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
| A | BONNEAU CAROLINE ET AL: "Expression of the rice yellow mottle virus P1 protein in vitro and in vivo and its involvement in virus spread." VIROLOGY, vol. 244, no. 1, 25 avril 1998 (1998-04-25), pages 79-86, XP002149717 ISSN: 0042-6822 le document en entier | 1-14 |
| A | US 5 898 097 A (GAFNY RON ET AL) 27 avril 1999 (1999-04-27) le document en entier | 1-14 |
| -/-- | | |
| <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </div> | | |
| * Catégories spéciales de documents cités: | | |
| <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"&" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div> | | |
| Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center;">16 octobre 2000</div> | | Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center;">30/10/2000</div> |
| Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 | | Fonctionnaire autorisé <div style="text-align: center;">Reuter, U</div> |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/Fr 00/01723

| C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | |
|---|---|-------------------------------|
| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
| A | <p>OPALKA NATACHA ET AL: "Movement of rice yellow mottle virus between xylem cells through pit membranes." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 95, no. 6, 17 mars 1998 (1998-03-17), pages 3323-3328, XP002149718 March 17, 1998 ISSN: 0027-8424 le document en entier</p> | 1-14 |
| A | <p>ALBAR, L. (1) ET AL: "Genetic basis and mapping of the resistance to rice yellow mottle virus: I. QTLs identification and relationship between resistance and plant morphology." THEORETICAL AND APPLIED GENETICS, (NOV., 1998) VOL. 97, NO. 7, PP. 1145-1154., XP000892947 le document en entier</p> | 1-14 |
| A | <p>PRESSOIR, G. ET AL: "Genetic basis and mapping of the resistance to rice yellow mottle virus: II. Evidence of a complementary epistasis between two QTLs." THEORETICAL AND APPLIED GENETICS, (NOV., 1998) VOL. 97, NO. 7, PP. 1155-1161., XP000892950 le document en entier</p> | 1-14 |
| A | <p>WO 98 30721 A (PIONEER HI BRED INT ;BIRO RONALD L (US); FEAZEL RHONDA (US); HELEN) 16 juillet 1998 (1998-07-16) le document en entier</p> | 1-14 |
| P,X | <p>DATABASE EMBL 'en ligne! embl; Database entry/Accession number AZ132900, 10 juin 2000 (2000-06-10) WING ET AL : "A BAC sequencing framework to sequence the rice genome" XP002149653 97,5 % identity to Seq.ID.no. 9 in a 121 nt overlap abrégé</p> | 8-14 |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 00/01723

| Document brevet cité au rapport de recherche | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | Date de publication |
|---|------------------------|---|------------------------|
| US 5898097 A | 27-04-1999 | AUCUN | |
| WO 9830721 A | 16-07-1998 | AU 6024598 A | 03-08-1998 |